ZUR REAKTION VON CANCEROGENEN SUBSTANZEN MIT GUANINNUCLEOTIDEN

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg - August - Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Hans - Dieter Hoffmann
aus Jena

Göttingen 1968

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544311_0029

Zur Reaktion von cancerogenen Substanzen mit Guaninnucleotiden

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Hans-Dieter Hoffmann
aus Jena

D 7

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Referent: Privatdozent Dr. W. Müller
Korreferent: Professor Dr. H. Brockmann

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Mai 1968

Die vorliegende Arbeit wurde im Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen unter der Leitung von Herrn Privatdozent Dr. W. Müller in der Zeit von Februar 1966 bis März 1968 durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer,
Herrn Privatdozent Dr. W. Müller,
möchte ich für seine vielen Anregungen
und Hinweise herzlich danken.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Einleitung und Problemstellung	1
II.	Versuche zum Reaktionsmechanismus der Arylierung von Purinbasen	4
III.	Zur Struktur eines Additionsprodukts aus 3,4-Benzpyren und Guanin bzw. Guanosin	5
	a) allgemeine Vorbemerkungen	5
	b) Isolierung eines Addukts aus 3,4-Benzpyren und Guanin, bzw. Guanosin, aus Bestrahlungsversuchen	7
	c) Synthese von 3,4-Benzpyrenyl-5-guanin-8	12
	α) Synthese des 5-Säurechlorids	15
	β) die Acylierungsreaktion	21
	γ) die Cyclisierung	23
	d) Vergleiche der verschiedenen Benzpyrenyl-guaninpräparate	24
IV.	Reaktionen anderer cancerogener Verbindungen mit Guanosin	28
	a) 1-Phenyl-3,3-dimethyltriazen	29
	b) Diazomethan	30
	c) Diazoessigester	33
	d) 4-Hydroxylaminochinolin-N-oxyd	34
V.	Diskussion	37
VI.	Zusammenfassung der Ergebnisse	44
VII.	Beschreibung der Versuche	45
VIII.	Literaturverzeichnis	61

I. Einleitung und Problemstellung

Durch umfangreiche Experimente konnte in den vergangenen Jahrzehnten für zahlreiche strukturell sehr verschiedene Substanzen eine krebserregende Wirkung im Organismus nachgewiesen werden [1;2]. Bisher ist aber für keine dieser Verbindungen geklärt, wie sie in den Zellstoffwechsel eingreifen, so daß schließlich für eine einzelne Zelle die Wachstumskontrolle verloren gehen kann. Da es sich offensichtlich um eine bleibende Veränderung der Zelle handelt, muß man annehmen, daß cancerogene Substanzen mit Zellbestandteilen reagieren und damit deren Funktionsweise spezifisch verändern können. Für diese Annahme sprechen verschiedene Nachweise einer assoziativen - der sogenannten physikalischen - und einer kovalenten - der sogenannten chemischen - Bindung cancerogener Verbindungen an die Nucleinsäuren einer Zelle [4;5;6].

Die früher mehrfach diskutierte Annahme einer bleibenden Zellveränderung - auch über Zellteilungen hinweg - als Folge der experimentell ebenfalls nachweisbaren Reaktionen cancerogener Substanzen mit Proteinen [3a;3b] ist nicht mehr gerechtfertigt, da man inzwischen erkannt hat, daß praktisch alle Proteine im Verlaufe der von Nucleinsäuren gesteuerten Proteinbiosynthese sowohl vor als auch nach einer Zellteilung neu synthetisiert werden können.

Von den zuerst genannten Reaktionen der Nucleinsäuren mit cancerogenen Verbindungen würde die kovalente Bindung dieser Substanzen an die Desoxyribonucleinsäure (DNS) einer Zelle die Voraussetzungen für eine bleibende Veränderung wohl am besten erfüllen. Auf welche Weise diese bisher in Einzelfällen nachgewiesene Reaktion erfolgt, war bisher nicht bekannt. Damit ergibt sich die Frage nach Reaktionen, die die strukturell sehr verschiedenartigen Cancerogene mit den Bausteinen der Nucleinsäuren eingehen könnten. Im Hinblick auf die schon bekannten

Reaktionen der DNS mit zellfremden Substanzen ist dabei noch folgendes zu beachten:

1. Die hervorgerufenen irreversiblen Veränderungen an der DNS dürfen nicht so drastisch sein, daß die gesamte genetische Information, ähnlich wie bei der Wirkung einiger Antibiotika, sowohl für die Proteinbiosynthese als auch für die DNS-Replikation blockiert wird.

2. Da man nur teilweise eine Korrelation zwischen mutagener und onkogener Wirkung von Cancerogenen nachweisen kann, sollten die hier angenommenen irreversiblen Veränderungen auf andere Weise zustande kommen, als es von mutationsauslösenden Reaktionen an Nucleinsäurebasen bekannt ist.

Im Rahmen der Untersuchungen zur Fluoreszenzmarkierung von Nucleinsäuren wurde eine Reaktion gefunden, die den oben genannten Forderungen möglicherweise Rechnung trägt [7]. Es konnte gezeigt werden, daß Diazoniumsalze unter physiologischen Bedingungen mit dem in Polynucleotiden enthaltenen Guanin unter Verlust des Diazostickstoffs zu 8-Aryl-Guaninderivaten reagieren. Diese Arylierung, die wahrscheinlich über Aryl-Radikale abläuft, führt nicht zu einer Labilisierung der N-Glykosidbindung, wie dies bei der als Mutationsreaktion bekannten 7-Alkylierung von Guaninnucleotiden aufgefunden wurde [8].

Die Bedingungen, unter denen eine kovalente Bindung von 3,4-Benzpyren und einigen anderen cancerogenen Substanzen an DNS in vitro bisher erreicht wurde [6], ließen vermuten, daß es bei diesen Reaktionen zu einer analogen Radikal-Substitution kommen könnte. Von H.F.Park [9] wurde bereits 1950 darauf hingewiesen, daß bei der Cancerogenese freie Radikale eine Rolle spielen könnten, wobei seinerzeit die SH-Gruppen der Peptide als Angriffspunkte in der Zelle angesehen wurden. Wenig früher hatte L.F.Fieser [11] versucht, für polycyclische Kohlenwasserstoffe eine Korrelation zwischen cancerogener Wirkung und allgemeiner chemischer Reaktivität nachzuweisen; woraufhin H.F.Park [12] darauf aufmerksam machte, daß im Zellstoffwechsel Radikalreaktionen im Verlaufe

der Oxydation polycyclischer Kohlenwasserstoffe möglich sein sollten. Reaktionen dieser Art werden in neuerer Zeit im Zusammenhang mit dem Wirkungsmechanismus von Oxygenasen diskutiert (H.Staudinger [13]).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb zunächst anhand von Modellreaktionen geklärt werden, ob 3,4-Benzpyren unter entsprechenden Bedingungen (Radikalerzeugung durch UV- oder Röntgenbestrahlung) analog der oben angeführten Arylierung mit dem in Polynucleotiden enthaltenen Guanin zu einem in 8-Stellung substituierten Guaninderivat zu reagieren vermag. Im Anschluß daran sollte geprüft werden, ob außer den polycyclischen Kohlenwasserstoffen auch Vertreter anderer cancerogener Substanzgruppen zu analogen Radikalreaktionen mit dem Guanin fähig sind. Beide Fragestellungen konnten jedoch nur dann sinnvoll sein, wenn sich zuvor die oben erwähnte Annahme, daß die 8-Substitution des Guanins über Arylradikale verläuft, experimentell bestätigen ließ. Deshalb wurde zunächst ein Guaninnucleotid in einer als Radikalreaktion bekannten Umsetzung als Reaktionspartner verwandt, da aus der Struktur der dabei erhaltenen Reaktionsprodukte eine Antwort zu dieser Frage zu erwarten war.

II. Versuche zum Reaktionsmechanismus der Arylierung von Purinbasen

Im Hinblick auf die allgemein bekannten Voraussetzungen für Arylierungen in der Präparativen Chemie (inerte Lösungsmittel, hohe Konzentration der Reaktionspartner usw.) erscheint die Annahme einer Radikal-Arylierung der Purinbasen durch Diazoniumsalze in wässrigem Medium zunächst recht ungewöhnlich. Unabhängig von den bisherigen experimentellen Beweisen (Struktur der Reaktionsprodukte, Reaktionshemmung durch Radikalinhibitoren) muß man aber berücksichtigen, daß Radikal-Reaktionen in wässrigem Medium schon lange Zeit im Zusammenhang mit den vielfältigen Redox-Reaktionen im Zellstoffwechsel diskutiert werden [13]. Auch die Strukturveränderungen, die Mono- oder Polynucleotide bei UV- oder Röntgenbestrahlung erfahren, lassen sich zwanglos als Folgen von Radikal-Reaktionen deuten [14;15]. Allerdings sind solche direkten Vergleiche nur bedingt gültig, da man im ersten Fall (Redox-Reaktionen, enzymatische Oxydationen) einwenden kann, daß hierbei ja Enzyme ganz wesentlich beteiligt sind, und daß man bei Röntgen- oder UV-Bestrahlungen innerhalb gewisser Grenzen durch Dosissteigerung das Angebot an OH-Radikalen beliebig steigern kann.

Es ist daher zunächst erforderlich, die grundlegende Annahme einer Radikal-Reaktion bei der Arylierung der Purinbasen weitergehend zu sichern. Die für die Beantwortung solcher Fragen am besten geeigneten ESR-Messungen bringen am System Guanosin-Diazoniumsalz erhebliche Schwierigkeiten mit sich, denn die eigentlich interessierende Arylierung wird ja von den gleichzeitig ablaufenden Zerfallsreaktionen der Diazoniumsalze überlagert. Deshalb erscheint es sinnvoll, das Guanosin (als Vertreter anderer Purinbasen) zunächst als Reaktionspartner in einer als Radikal-Reaktion bekannten Umsetzung zu verwenden, um dann die Struktur der Reaktionsprodukte mit denen aus bekannten Reaktionssystemen zu vergleichen. Die Phenylierung von Heterocyclen nach Gomberg-Bachmann mit N-nitroso-acetanilid ist für

diesen Vergleich recht gut geeignet [16]. Im Falle des Pyridins erhält man dabei die drei möglichen Phenyl-Pyridine. Für das Guanosin (oder das entsprechende Nucleotid) dürfte man demnach das 8-Phenylguanosin erwarten.

Dementsprechend wurde Guanosin-2'-(3')-monophosphat (beste Löslichkeit in nahezu neutraler Lösung) in Phosphatpuffer (pH 7,8) mit N-nitroso-acetanilid umgesetzt. Als Lösungsvermittler mußten etwa 5 % (Vol.) DMSO oder DMF zugegeben werden. Nach einer Reaktionszeit von mindestens 12 Stunden (bei 30-35° C) und einer anschließenden Säurehydrolyse läßt sich im entsprechend aufgearbeiteten Reaktionsgemisch das erwartete 8-Phenylguanin durch elektrophoretischen Vergleich mit authentischem 8-Phenylguanin, welches nach H.Terzian und J.F.E.Chinoperos [17] synthetisiert wurde, sicher nachweisen. Auch die R_f-Werte in verschiedenen Papierchromatographiesystemen und Daten der UV-Spektren ließen sich reproduzieren.

Damit dürfte noch weitergehend als bisher gesichert sein, daß die Arylierung von Guaninnucleotiden in 8-Stellung des Purinkerns über Arylradikale erfolgen kann, wobei zu erwarten ist, daß die Art der Radikalerzeugung kaum eine Rolle spielt

III. Zur Struktur eines Additionsprodukts aus 3,4-Benzpyren und Guanin bzw. Guanosin

a) Allgemeine Vorbemerkungen

In wässrigen Lösungen kann man durch UV- oder Röntgenbestrahlung (der Reaktionslösung) die kovalente Bindung von 3,4-Benzpyren an Nucleinsäurebausteine in sicher nachweisbaren Mengen erreichen [6]. Dabei ist zu erwarten, daß (insbesondere bei Röntgenbestrahlungen) Neutral-Radikale des Benzpyrens entstehen, die dann analog der Radikal-Arylierung des Guanosins durch Diazoniumsalze mit dem Guanosin oder den entsprechenden Nucleotiden zum 3,4-Benzpyrenyl-5-Guanosin-8 reagieren können.

Von E.Wilk [18] ist ferner eine Reaktion beschrieben worden, nach der man durch Einwirkung von Jod auf 3,4-Benzpyren (an Kieselgel adsorbiert) die entsprechenden Radikal-Kationen erzeugen kann, die dann mit gleichzeitig anwesenden nucleophilen Reaktionspartnern (z.B. Pyridin, Nucleinsäurebasen) als N-Benzpyrenylverbindungen abgefangen werden. Nach P.Ts'o[19] ist diese Reaktion auch in Wasser möglich. Auf die Problematik, die sich aus den unterschiedlichen Reaktionen von Neutralradikalen und Radikal-Kationen mit Nucleinsäuren ergibt, soll erst in der Diskussion aller Ergebnisse (Seite 37) ausführlicher eingegangen werden. Wenn sich zeigen läßt, daß die oben geäußerte Vermutung zutrifft, nämlich daß Benzpyren über Neutral-Radikale in der 8-Stellung des in Polynucleotiden enthaltenen Guanins gebunden werden kann, dann wäre damit eine Reaktion gefunden, nach der ein polycyclischer Kohlenwasserstoff mit Nucleinsäuren zu reagieren vermag, ohne deren Überstrukturen weitgehend zu zerstören. Dabei soll zunächst die Frage nach der Herkunft der Neutralradikale in der Zelle offen bleiben.

Für den experimentellen Nachweis einer 8-Substitution am Guanin bzw. Guanosin durch Benzpyren ergeben sich zwei Möglichkeiten:

1. Man wiederholt die Bestrahlungsversuche und versucht unter den dabei erhaltenen Reaktionsprodukten das erwartete Addukt (in diesem Fall 3,4-Benzpyrenyl-5-guanin-8 (3)) anhand spektroskopischer und analytischer Daten zu identifizieren.

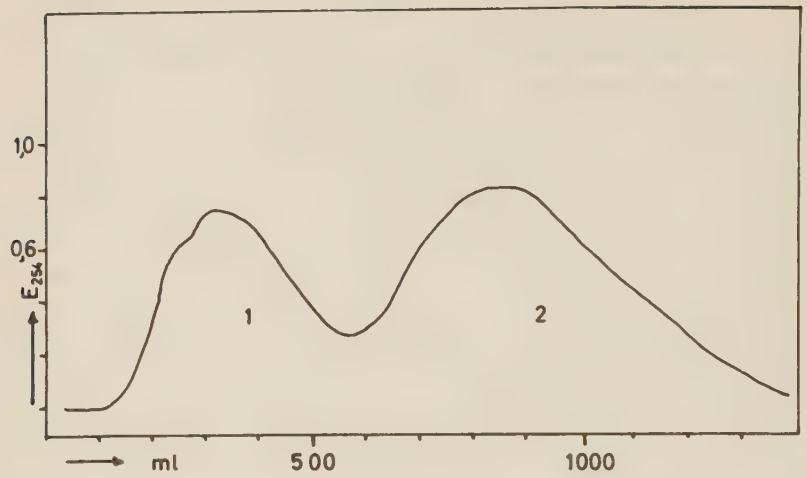
2. Man synthetisiert zunächst das erwartete Addukt und versucht nun dieses durch Vergleich im Reaktionsgemisch eines Bestrahlungsversuchs nachzuweisen.

Bei beiden Verfahren stößt man jedoch schon bald auf erhebliche experimentelle Schwierigkeiten. Während man aus den Bestrahlungsversuchen nur geringe Produktmengen erhält, deren Trennung, Anreicherung und Reinigung zum Teil sehr langwierig und problematisch ist, ergeben sich bei der Synthese als Folge des außergewöhnlichen chemischen Verhaltens des 3,4-Benzpyrens unerwar-

tete Probleme. Ich habe deshalb beide Wege kombiniert.

b) Isolierung eines Addukts aus 3,4-Benzpyren und Guanin bzw. Guanosin aus Bestrahlungsversuchen

In Anlehnung an das Verfahren von J.M.Rice [20] wurde Guanin in wässrigen Natriumdodecylsulfat-Lösungen zusammen mit 3,4-Benzpyren 24 bis 48 Stunden lang mit einer Quecksilbertauchlampe (QS 81; Fa. Quarzlampengesellschaft Hanau) bestrahlt. Die Belichtung wurde sowohl in neutraler als auch in alkalischer Lösung (pH 11-12) vorgenommen, wobei der Umsatz infolge der besseren Löslichkeit des Guanins bei pH 12 sehr viel besser war als bei pH 7. Allerdings traten in der alkalischen Reaktionslösung sehr viel mehr Reaktionsprodukte auf, deren Bildung wohl auf eine gesteigerte Oxydation des Benzpyrens und seiner Derivate in alkalischem Medium zurückzuführen ist. Außerdem ist anzunehmen, daß unter diesen Bedingungen auch Radikal-Kationen entstehen, die dann analog der von E.Wilk [18] beschriebenen "Jod-Reaktion" mit der Base reagieren werden. Die Reaktionslösungen wurden nach der Bestrahlung lyophilisiert und die Rückstände in Alkohol aufgenommen, da der größte Teil des Dodecylsulfats beim Eingengen der alkoholischen Lösungen ausfällt und so recht gut entfernt werden kann. Die noch in Lösung verbleibenden Reste lassen sich über einen Ionenaustauscher (Dowex 1 X8) vollständig entfernen, wobei gleichzeitig eine grobe Auftrennung der Reaktionsprodukte erfolgt. Ein typisches Elutionsdiagramm einer solchen Trennung ist in Abb. 1 wiedergegeben.



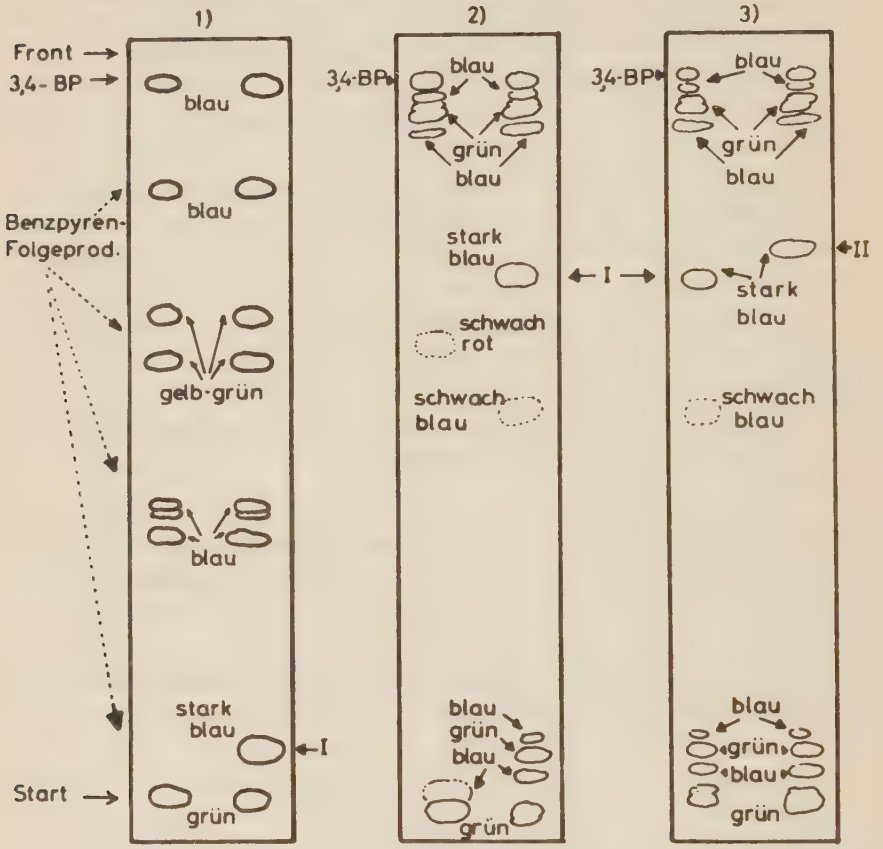
Abbild. 1 Elutionsdiagramm der Ionenaustauscher-Trennung Dowex 1 X8; Säule 2 x 16 cm; Äthanol als Elutionsmittel

Eine nachfolgende Untersuchung der Eluate im Dünnschichtchromatogramm an Kieselgel G (Systeme: A = Benzol / B = Benzol: Petroläther:Äthanol:Triäthylamin 60:25:10:5 / C = Äthanol: Petroläther:Chloroform:konz.Ammoniak 50:15:20:15) zeigte, daß am Ionenaustauscher eine unvollständige Auftrennung der Reaktionsprodukte in zwei Gruppen erfolgt. Die in Zone 1 enthaltenen Produkte (wobei auch Guanin zu finden ist) lassen sich an Kieselgel G nur in relativ polaren Systemen weiter auftrennen, während dies für die in Zone 2 enthaltenen Verbindungen (wobei der größte Teil des Benzpyrens zu finden ist) schon in relativ unpolaren Systemen möglich ist. Eine der ersten Elution des Ionenaustauschers (mit reinem Äthanol) nachfolgende Gradientenelution mit 0,01 bis 0,1 n äthanolischer HCL erbringt im Eluat neben wenig Dodecylsulfat noch eine dritte Gruppe fluoreszierender Produkte, die sich analog den in Zone 1 enthaltenen Ver-

bindungen nur in relativ polaren Systemen an Kieselgel G dünnschichtchromatographisch auftrennen lassen. Zur Kontrolle dieser Trennverfahren wurde ein Teil der Reaktionslösung direkt im Dünnschicht-Chromatogramm am Kieselgel G aufgetrennt, wobei sich zeigen ließ, daß keins der im Dünnschicht-Chromatogramm nachweisbaren Produkte am Ionenaustauscher so fest adsorbiert wird, daß es nach dieser Trennung nicht mehr nachweisbar gewesen wäre. Die Aufteilung der einzelnen Produkte in die verschiedenen Gruppen ist so unvollständig, daß es sinnvoller erschien, zumindest die ersten beiden Eluate (Zone 1 und 2) zu vereinigen, um dann die entsprechenden Vergleiche mit den Produkten vorzunehmen, die man bei der Photolyse des Benzpyrens (unter gleichen Bedingungen) ohne Guanin (Kontrollversuch) oder mit Guanosin - statt Guanin - erhält. Die Dünnschichtchromatogramme dieser Reaktionsgemische sind in Abbild. 2 (Seite 10) schematisch wiedergegeben.

Im Vergleich mit dem Kontrollversuch (Photolyse ohne Base) ist zwar eine Teilzuordnung der im UV-Licht verschiedenfarbig fluoreszierenden Zonen möglich, doch die in den übrigen Zonen enthaltenen Substanzen kann man nur qualitativ in Haupt- und Nebenprodukte und nach ihrem chromatographischen Verhalten als polare oder unpolare Verbindungen einstufen.

Abb.2 Wiedergabe von Dünnschichtchromatogrammen (vergl. Text S. 11)



Kontrollversuch 3,4BP ohne Base

Peak 1+2 3,4BP mit Guanin (vergl. S)

Kieselgel G
System: A
Benzol
(4x entwickelt)

Chromatogramm 1) im System B (s.unten) entwickelt

Kieselgel G
System: B

Benzol	60 Vol.%
Äthanol	10
Petroläther	15
Triäthylamin	5

Peak 1+2 3,4BP mit Guanin

3,4BP mit Guanosin statt Guanin

Kieselgel G
System: B

Neben den Zonen ist jeweils die Fluoreszenzfarbe (Anr. 365 mμ) angegeben.

Bei der Auftrennung mit Benzol (System A) als Laufmittel an Kieselgel G (viermaliges Entwickeln) findet man neben den Benzpyrenprodukten eine intensiv blau fluoreszierende Zone (I), die wohl als Hauptprodukt der gesamten Reaktion einzustufen ist und wie später gezeigt wird, das 3,4-Benzpyrenyl-5-guanin-8 (3) enthält. Bei der nachfolgenden Entwicklung der gleichen Chromatogramme im System B wandern aus dem Startfleck noch mehrere im UV-Licht blau bis grün fluoreszierende Zonen (R_f 0,1-0,2) heraus; die darin enthaltenen Verbindungen scheinen Addukte aus Benzpyren-Radikal-Kationen und Guanin zu sein (W.Girke, Diplomarbeit *).

Die im System B noch am Start verbleibenden geringen Mengen gelbgrün fluoreszierender Pordukte entsprechen im wesentlichen den Substanzen, die man bei der HCL-Elution vom Ionenaustauscher ablöst und die auch im Kontrollversuch zum Teil auftreten.

Folgende Beobachtungen führten zu der Annahme, daß es sich bei der in Zone I enthaltenen Verbindung um ein in 8-Stellung durch Benzpyren substituiertes Guanin handeln könnte:

1. Das entsprechende Pyrenderivat, welches aus Pyren-3-diazoniumsulfat und Guanosin hergestellt wurde, zeigt ein ähnliches chromatographisches Verhalten.

2. Andere Produkte, die man nach dem chromatographischen Vergleich (System B) mit dem Kontrollversuch auch als Addukte aus Benzpyren und Guanin identifizieren kann, dürften kaum als 8-substituierte Guaninderivate anzusehen sein, denn man kann sie in gleicher Weise in Bestrahlungsansätzen nachweisen, in denen Guanosin anstelle der Guaninbase verwandt wurde. Dies ist aber nur verständlich, wenn man annimmt, daß im letzten Fall der Zucker abgespalten wird, oder daß der Purinkern so drastisch verändert wird (z.B. Öffnung des Imidazolrings im Puringerüst), daß der Zucker nur noch eine untergeordnete

---

* Herrn Prof. Dr.E.Wilk danke ich für die kurzfristige Überlassung der Arbeit.

Rolle für die chromatographischen Eigenschaften dieser Verbindungen spielt. Beide Folgereaktionen sollten bei der 8-Substitution analog der Arylierung durch Diazoniumsalze nicht auftreten.

3. Aus den Bestrahlungsansätzen mit Guanosin konnte ein dem Produkt I chromatographisch sehr ähnliches im UV-Licht blau fluoreszierendes Produkt II isoliert werden, dem man die Struktur des Benzpyrenylguanosins zuordnen könnte. Es unterscheidet sich von I durch den etwas niedrigeren R_f-Wert bei Auftrennung an Kieselgel G (System B); im Orcintest nach W.Mejbaum [25] zeigt die Substanz die für Pentosen charakteristische Grünfärbung und durch Säurehydrolyse (1 n äthanolischer HCl) läßt sich diese Verbindung in I überführen.

Die Anreicherung des in Zone I enthaltenen Produkts wurde zwar vorgenommen, doch die hierbei isolierten geringen Substanzmengen reichten nicht für eine vollständige Strukturermittlung aus. Damit erschien es sinnvoll, die erwartete Verbindung zu synthetisieren, um dann durch Vergleiche die Struktur zu sichern

Hierbei ist zunächst noch die Frage offen, über welches C-Atom der Benzpyrenrest am C_8-Atom des Puringerüsts gebunden wird. Es ist jedoch zu erwarten, daß die Verknüpfung über die 5-Stellung erfolgt, da sich diese in den verschiedenen chemischen Reaktionen (auch Radikalreaktionen) des Kohlenwasserstoffs als bevorzugte Reaktionsstelle erwiesen hat.

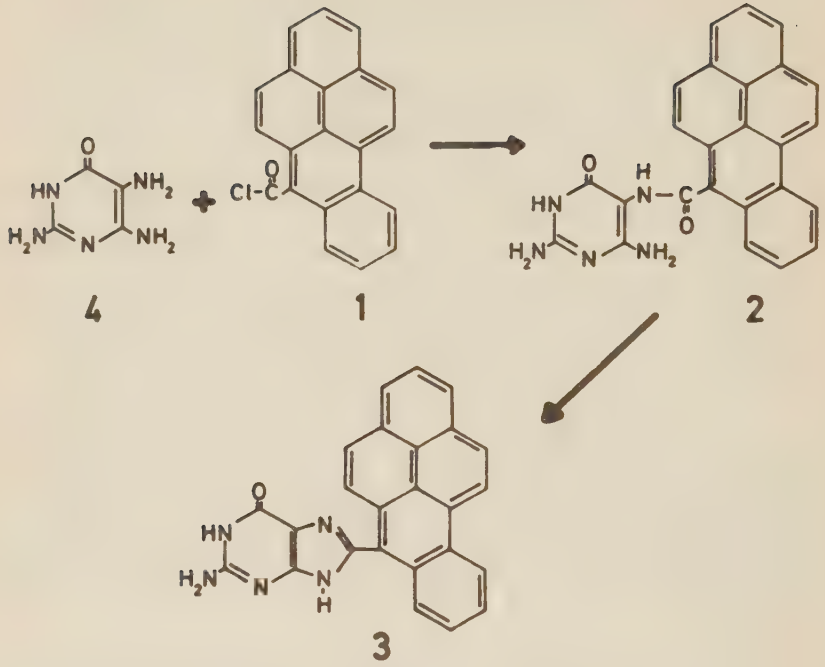
c) Synthese von 3,4-Benzpyrenyl-5-guanin-8 (3)

Für eine Darstellung dieser Verbindung erscheint es zunächst naheliegend die Radikal-Arylierung durch Diazoniumsalze nach H.D.Hoffmann und W.Müller [7] zu benutzen. Ungeachtet der Schwierigkeiten, die sich dabei infolge der verschiedenen Nebenreaktionen ergeben würden, scheitert dieses Vorhaben daran, daß es auch bei vorsichtigstem Arbeiten nicht gelingt ein Diazoniumsalz aus dem 5-Amino-3,4-Benzpyren darzustellen. Diese Erfahrungen decken sich mit den Angaben von L.F.Fieser [21], der

bereits 1940 über Experimente berichtet hat, bei denen er sich vergeblich um die Isolierung eines Benzpyrendiazoniumsalzes bemüht hat. Bei der Wiederholung dieser Versuche habe ich - ebenfalls ohne Erfolg - versucht, durch möglichst schnelle Zugabe einer Kupplungskomponente wenigstens die intermediäre Bildung der Diazoverbindung nachzuweisen.

Analog der Reaktion des N-nitroso-acetanilids mit Guanosin zu 8-Phenylguanosin wäre an eine Reaktion des 5-nitroso-acetamino-benzpyrens mit dem Guanosin zu denken. Das dafür erforderliche 5-Acetamino-benzpyren ist sowohl durch Acetylierung des nach L.F.Fieser und E.B.Hershberg [21] dargestellten 5-Aminobenzpyrens als auch über die reduktive acetylierende Spaltung (Zinkstaub-Eisessig) des Azofarbstoffs aus p-Nitranilin und Benzpyren (L.F.Fieser [22]) möglich. Die entsprechende 10-Acetaminoverbindung stand mir aus der Chemikalien-Sammlung des Instituts aus Nachlässen von A.Windaus zur Verfügung. Die Nitrosierung mit Nitrosylchlorid führte jedoch bei beiden Acetaminoverbindungen zu einer solchen Vielzahl von Produkten, daß mir weitere Versuche in dieser Richtung aussichtslos erschienen.

Aus diesem Grunde sollte das gewünschte Guaninderivat 3 nach folgendem Syntheseschema schrittweise aufgebaut werden.



4 1 2 3

Nach einem Verfahren von J.F.E.Chinoperos und H.Terzian [17] acyliert man selektiv die Aminogruppe in 5-Stellung des 2,4,5-Triamino-6-hydroxypyrimidins (4) mit einem Säurechlorid und cyclisiert dieses Acylprodukt in Polyphosphorsäure zum entsprechenden Guaninderivat. Im vorliegenden Falle war als Säurechlorid für den ersten Schritt das 3,4-Benzpyren-5-carbonsäurechlorid (1) erforderlich.

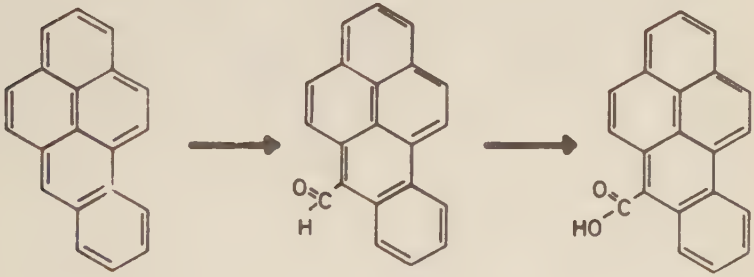
Die gesamte Synthese des 3,4-Benzpyrenyl-5-guanin-8 (3) zerfällt somit in folgende Teilschritte:

α) Synthese des 3,4-Benzpyren-5-carbonsäurechlorids
β) die Acylierungsreaktion
γ) die Cyclisierung des Acylprodukts

α) Synthese des 3,4-Benzpyren-5-carbonsäurechlorids (1)

Für die Darstellung der bisher unbekannten 3,4-Benzpyren-5-carbonsäure (6) als wichtigste Vorstufe zum Säurechlorid habe ich folgende Synthese-Wege eingehender untersucht:

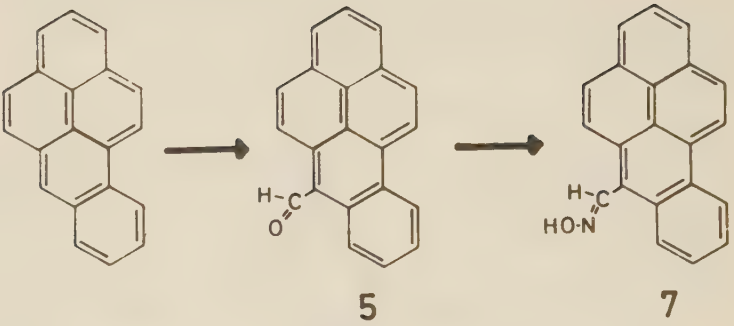
1.



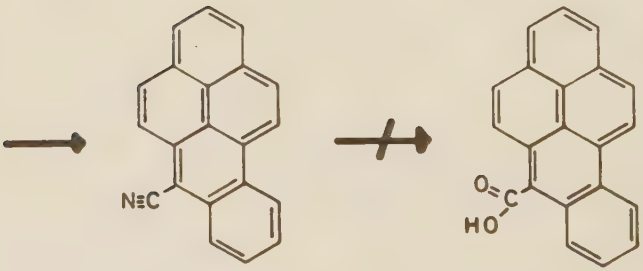
5 6

Der bereits von L.F.Fieser [23] beschriebene 3,4-Benzpyren-5-aldehyd (5) läßt sich relativ leicht aus Benzpyren und N-formylanilin darstellen. Dieser sollte dann in einem möglichst milden Verfahren zur Carbonsäure (6) oxydiert werden. Alle Versuche, den nach L.F.Fieser dargestellten Benzpyren-5-aldehyd (5) direkt zur Säure (6) zu oxydieren, scheiterten an der leichten Oxydierbarkeit des Benzpyrens in der 8- oder 10-Stellung. Zwar konnte ich aus den Reaktionsgemischen die Säure (6) in sehr geringer Menge dünnschichtchromatographisch nachweisen, doch lagen die Ausbeuten kaum über 1 %. Daß es sich bei einem der Reaktionsprodukte tatsächlich um die erwartete Säure handelte, wurde zunächst aufgrund des chromatographischen Verhaltens im Vergleich mit der Benzpyren-10-carbonsäure, die mir als authentisches Vergleichsmaterial zur Verfügung stand, angenommen. Mit der unter 4. beschriebenen Strukturzuordnung konnte diese Annahme nachträglich bestätigt werden.

2.



5 7

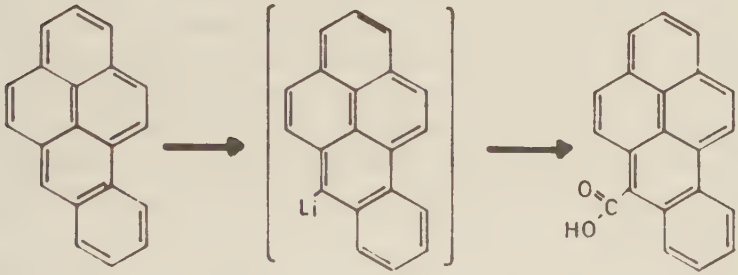


8 6

Der Weg vom 3,4-Benzpyren-5-aldehyd (5) über das Oxim (7) zum Nitril (8) und dessen Verseifung zur Carbonsäure (6) bot eine Möglichkeit, die unerwünschten Nebenreaktionen bei der Aldehydoxydation zu umgehen. In einigen Vorversuchen mit Proben des 3,4-Benzpyren-10-nitrils konnte man erkennen, daß die Verseifung zur entsprechenden Säure möglich ist, obwohl man schon recht rauhe Bedingungen anwenden muß (Bombenrohr 170-200° C, konz.HCl;Glykol;äthanolische KOH). Die Versuche, das nach der Vorschrift von A. Windaus [24] hergestellte 5-Nitril (8) auf ähnliche Weise zu verseifen, erbrachte nicht die gewünschte Verbindung, denn unter den erwähnten Verseifungsbedingungen wird die entstehende Säure (6) so leicht decarboxyliert, daß man im

Reaktionsgemisch überwiegend 3,4-Benzpyren findet. Bei milderen Verfahren gewinnt man nur das Ausgangsprodukt zurück.

3.



6

In Anbetracht der hohen Reaktivität der 5-Stellung konnte man erwarten, daß sich Benzpyren gerade in dieser Stellung metallieren läßt und daß sich dann durch Einwirkung von CO_2 die Carbonsäure (6) ergeben müßte. In einem entsprechenden Versuch wurde Benzpyren in trockenem THF unter Stickstoff mit n-Butyl-Lithium umgesetzt und anschließend wurde in die tiefviolette Reaktionslösung CO_2 eingeleitet. Bei der anschließenden dünnschichtchromatographischen Auftrennung des Reaktionsgemischs konnte ich durch Vergleich sowohl die bekannte 10-Säure als auch die 5-Säure (6) als blau fluoreszierende (UV Licht 365 mμ) Zonen identifizieren. Da bei dieser Reaktion jedoch neben den isomeren Säuren noch andere von diesen schwer abtrennbare Produkte entstehen, kam diese Synthese nur in Frage, wenn sich keine bessere finden ließ.

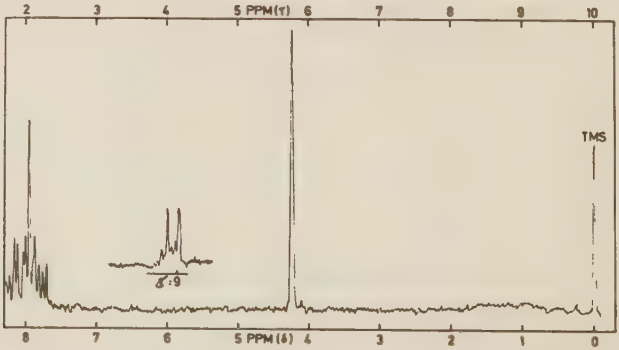
4. Bei der Synthese der Anthracen-9-carbonsäure wurde die Umsetzung des Kohlenwasserstoffs mit Oxalylchlorid ohne Friedel-Crafts-Katalysator erfolgreich angewandt [26]. Analoge Versuche mit dem 3,4-Benzpyren zeigten, daß dies offenbar der beste

Syntheseweg für die 5-Carbonsäure (6) ist. In Anlehnung an die Bedingungen beim Anthracen wurde 3,4-Benzpyren mit Oxalylchlorid in Nitrobenzol bei 120° umgesetzt. Hierbei entsteht mit recht guter Ausbeute die Benzpyren-5-carbonsäure (6) neben etwas 5-Säurechlorid (1) und den entsprechenden 10-Derivaten, (die 10-Säure und das 10-Säurechlorid). Letztere entstehen fast ausschließlich, wenn man die Reaktionstemperatur über 120° ansteigen läßt. Versuche, den Anteil an Säurechlorid (1) auf Kosten der Säure (6) zu steigern, um so die nachträgliche Umwandlung zu sparen, verliefen negativ. Eine befriedigende Antwort auf die Frage, warum unter sorgfältigem Wasserausschluß nicht ausschließlich das Säurechlorid entsteht, konnte bisher nicht gefunden werden.

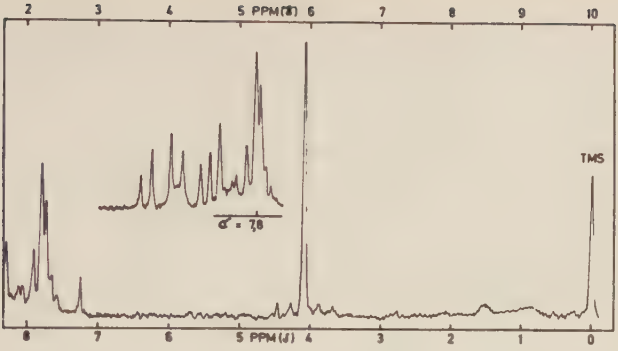
Das bei der oben genannten Reaktion erhaltene Rohprodukt wird zur Abtrennung der beiden isomeren Säurechloride von den Säuren in Chloroform an Kieselgel G chromatographiert. Die nachfolgende Isomerentrennung ist sowohl auf der Stufe der Säuren als auch bei den Säurechloriden durch präparative Dünnschichtchromatographie möglich.

Die Struktur der dargestellten 3,4-Benzpyren-5-carbonsäure (6) wurde anhand folgender Kriterien sichergestellt:

1. Analyse
2. NMR-Spektren der beiden isomeren Methylester; 10-Carbonsäuremethylester und 5-Carbonsäuremethylester (vergl. Abbild 3 u.4)



Abbild. 3 KMR-Spektrum des 3,4-Benzpyren-5-carbonsäuremethylesters



Abbild. 4 KMR-Spektrum des 3,4-Benzpyren-10-carbonsäuremethylesters

Das für die Ester-Methylgruppe (des 5-Derivats) zu erwartende Singulett ist bei δ = 4,24 zu sehen. Die geringfügige Verschiebung des Methylsignals gegenüber dem des Benzpyren-10-carbonsäuremethylesters dürfte auf sterische Einflüsse in der Umgebung der Estergruppe zurückzuführen sein. Im Bereich aromatischer Protonen erscheinen in beiden Spektren die schwer interpretierbaren Signale der am Benzpyrenkern gebundenen Wasserstoffatome.

3. chromatographisches Verhalten:
Bei der Dünnschichtchromatographie an Kieselgel G (System: Benzol:Chloroform:Äthanol:konz.Ammoniak/20:20:50:10) zeigt sich die von Windaus [24] dargestellte 10-Carbonsäure als blau fluoreszierende Zone (UV-Licht 365 mμ) mit dem R_f-Wert 0,6. Die 5-Carbonsäure (6) ist unter den gleichen Bedingungen ebenfalls als blau fluoreszierende Zone mit dem R_f-Wert 0,65-0,7 zu erkennen. Dieses Verhalten war aufgrund der Stellung der Carboxylgruppen und den sich dabei ergebenden Unterschieden der pK-Werte zu erwarten, denn die am elektronenreicheren C_5-Atom stehende Carboxylgruppe dürfte einen etwas höheren pK-Wert haben als die Carboxylgruppe in der 10-Stellung.

4. Vergleich mit einem auf anderem Weg erhaltenen Produkt

Bei der Oxydation des 3,4-Benzpyren-5-aldehyds (5) ist nicht zu erwarten, daß die Substituentenstellung sich ändert; d.h. die dabei chromatographisch nachweisbare geringe Menge Säure muß die 3,4-Benzpyren-5-carbonsäure (6) sein. Sie zeigt den gleichen R_f-Wert (Bedingungen wie unter 3 aufgeführt) wie das mit Oxalylchlorid gewonnene Produkt.

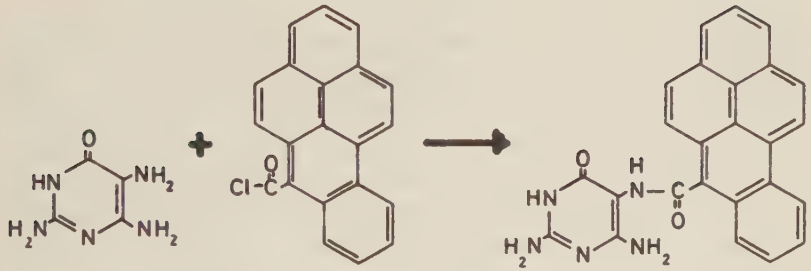
Die Benzpyren-5-carbonsäure (6) ließ sich mit PCl_5 in Phosphoroxychlorid in das Säurechlorid (1) überführen. Die sonst übliche Methode mit Thionylchlorid ist nicht anwendbar, da sie zu Oxydationsprodukten der Säure und des Säurechlorids führt. Wie oben schon erwähnt, kann man, ohne eine Zersetzung zu beobachten, sowohl dieses als auch das 10-Säurechlorid an Kieselgel G (System: Chloroform) chromatographieren, was auf eine hohe Stabilität gegen hydrolysierende Agentien hindeutet. Dies zeigt sich auch bei einem Hydrolyseversuch, bei dem nach 12-stündigem Stehen in äthanolischer NaOH noch unverändertes Säurechlorid (1) gefunden wird.

Die Struktur des isolierten 3,4-Benzpyrensäurechlorids ergibt sich aus folgenden Beobachtungen:

1. Das mit PCl_5 erhaltene Produkt zeigt im Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel G; System: Petroläther:Chloroform:Benzol/70:20:10) den gleichen R_f-Wert (0,25 gelbgrüne Fluoreszenz) wie eines der beiden Produkte aus der Reaktion mit Oxalylchlorid. Die zweite etwas schneller laufende Zone (R_f 0,3 blaugrüne Fluoreszenz) ist das aus der 3,4-Benzpyren-10-carbonsäure darstellbare 10-Säurechlorid.

2. Beide Säurechloride lassen sich in äthanolischer NaOH in die entsprechenden Säuren zurückspalten.

β) die Acylierungsreaktion



4 1 2

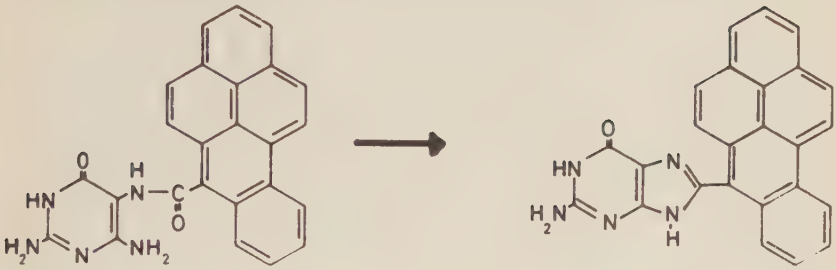
Nach dem von H.Terzian und J.F.E.Chinoperos [17] angegebenen Verfahren kann man die 5-Aminogruppe des 2,4,5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidins (4) in 1 n Natronlauge (0-20° C; 1-2 Std.) selektiv acylieren. Analoge Versuche mit dem 3,4-Benzpyren-5-säurechlorid (1) waren jedoch unter diesen Bedingungen erfolglos. Auch die Zugabe eines Acylierungskatalysators, wie Pyridin, zum Reaktionsgemisch führten zu keiner Umsetzung. Nur wenn man das Säurechlorid (1) mit dem Triaminohydroxpyrimidin (4) in Pyridin etwa 12 Stunden am Rückfluß erhitzt, kann man in sehr geringer Menge das gewünschte Acylprodukt (2) erhalten. Die Reaktion wurde auch über mehrere Tage (bis zu 70 Stunden) weitergeführt; dabei mußte aber unter allen Umständen sehr sorgfältig unter Stickstoff gearbeitet werden, da sonst sowohl das Pyrimidinderivat als auch die Benzpyrenverbindung oxydiert werden. In die Reaktionslösung wurde außerdem noch alle 6 bis 8 Stunden eine geringe Menge Natriumdithionit gegeben. Dieses Verfahren hatte sich bei allen Arbeiten mit dem sehr leicht oxydierbaren Triaminohydroxypyrimidin (4) als gute Schutzmaßnahme gegen Oxydationen erwiesen. Da die Ausbeute an Acylprodukt (2) trotz all dieser Bemühungen kaum höher als 1 bis 2 % war, versuchte ich die Acylierung nach den bei Peptidsynthesen üblichen Verfahren mit Dicyclohexylcarbodiimid oder mit

Woodward's Reagenz. Hierfür wurden Versuche in mehreren Lösungsmittelkombinationen unter den verschiedensten Bedingungen (Temperatur und Reaktionsdauer) vorgenommen.

Das oben beschriebene Acylprodukt (2) ließ sich bei keinem dieser Versuche im Reaktionsgemisch nachweisen. Aus dem chromatographischen Vergleich der dabei erhaltenen Produkte mit denen aus den entsprechenden Kontrollversuchen - mit Hilfsreagenz aber ohne Triaminohydroxypyrimidin - konnte man schließen, daß die eingesetzte Benzpyren-5-carbonsäure (6) (oder das Säurechlorid (1)) zum Teil mit dem Hilfsreagenz Addukte bildet, die dann aber nicht zum gewünschten Acylprodukt weiterreagieren. Die einfachste Erklärung für dieses Verhalten liefert die schon erwähnte Beobachtung, derzufolge das Benzpyren-5-säurechlorid (1) gegen hydrolysierende Agentien außergewöhnlich stabil ist. Dies wird einerseits auf der sterischen Anordnung des Substituenten am Kern des Kohlenwasserstoffs beruhen; andererseits muß man beachten, daß die Carboxylgruppe an dem elektronenreichsten C-Atom des Ringsystems gebunden ist, was auf jeden Fall den für eine basische Hydrolyse oder eine Aminolyse notwendigen nucleophilen Angriff am Carboxyl-C-Atom erschweren wird.

Setzt man das Acylprodukt (2) 1-2 Stunden lang bei 160-170° der Einwirkung von Polyphosphorsäure aus, wobei normalerweise ein Ringschluß zum Guaninderivat erfolgt und wobei in anderen Reaktions-Systemen [27] auch eine Spaltung von Amidbindungen möglich ist, so findet man im Reaktionsgemisch (nach Abtrennung des Phosphats) neben viel Benzpyren eine geringe Menge Benzpyren-5-carbonsäure (6) und Triaminohydroxypyrimidin (4), was nur mit dem ursprünglichen Vorliegen des auf S. 21 formulierten Acylprodukts (2) in Einklang zu bringen ist.

γ) die Cyclisierung



2 3

In Anbetracht der oben beschriebenen Rückspaltungsreaktion erscheint es zunächst sinnlos, nach praktisch dem gleichen Verfahren eine Cyclisierung des Acylpyrimidins (2) zum Guaninderivat (3) zu erwarten. Da andere Verfahren (Cyclisierung in NaOH-Schmelze oder in Phosphoroxychlorid) sich als kaum besser geeignet erwiesen, versuchte ich durch Verkürzung der Reaktionszeit die Umsetzung doch in Polyphosphorsäure zu erreichen. Wenn man das Reaktionsgefäß mit der in Polyphosphorsäure gelösten Substanz in ein vorgeheiztes Ölbad (120° C) nur für 15-20 Minuten (unter Stickstoff; gut gerührte Reaktionslösung) beläßt, dann kann man nach entsprechender Aufarbeitung ein neues blau fluoreszierendes Produkt (UV-Licht) chromatographisch nachweisen. Die dabei zu erhaltenden Mengen sind jedoch sehr gering. Das Auftreten von etwas Ausgangsprodukt (2), der Benzpyren-5-carbonsäure (6) und Triaminohydroxypyrimidin (4) (bzw. dessen Folgeprodukten) deutet darauf hin, daß auch unter diesen Bedingungen die Rückspaltung schon einsetzt und die Cyclisierung noch nicht sehr weit fortgeschritten ist. Daß sterische Faktoren diese Reaktion ebenfalls beeinträchtigen werden, läßt sich aus dem Kalottenmodell leicht ableiten, welches zeigt, daß nach der Cyclisierung die beiden Ringsysteme (Purin und Benzpyren) - ähnlich wie beim 9-Phenylanthracen - praktisch nicht mehr in einer gemeinsamen Ebene angeordnet werden können.

Als weitere Ursache für die geringe Ausbeute sind Schwierigkeiten bei der Aufarbeitung zu nennen, denn aus dem Reaktionsgemisch müssen große Mengen Phosphat entfernt werden, weil das Produkt in so geringen Mengen vorliegt, daß es beim Neutralisieren der wässrigen Phosphatlösung nicht ausfällt. Die Abtrennung des Phosphats läßt sich grundsätzlich durch Fällung - am besten als schwerlösliches Bariumphosphat - sowie mit Ionenaustauschern (z.B. Dowex 1 X8) durchführen. Beim ersten Verfahren wird die adsorptive Mitfällung von Reaktionsprodukten trotz mehrmaligen Waschens des Niederschlags mit Äthanol unter Ultraschalleinwirkung nicht auszuschließen sein. Beim zweiten Verfahren sind Austauschersäulen von solcher Größe erforderlich, daß schon geringe Adsorptionseffekte bei so kleinen Produktmengen hohe Substanzverluste nach sich ziehen.

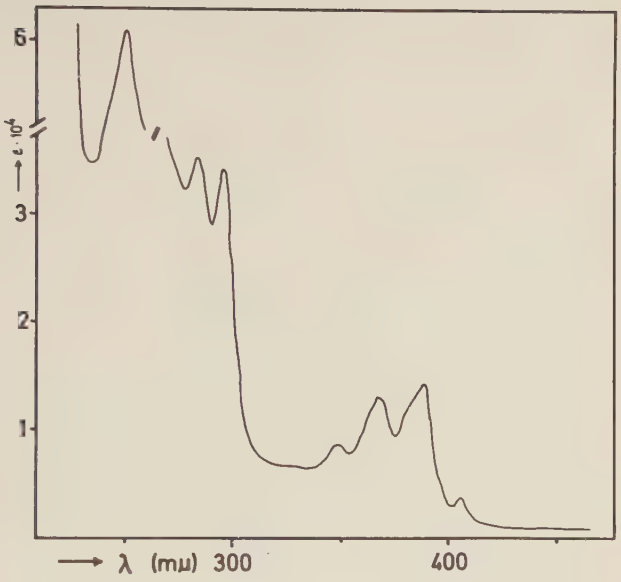
Trotz der aufgeführten Schwierigkeiten läßt sich das 3,4-Benzpyren-5-guanin-8 (3) auf diesem Wege gewinnen, doch größere Mengen (z.B. für Mikroanalysen) werden erst zugänglich, wenn es gelingt, diese Reaktion oder die vorhergehende Acylierung so zu lenken, daß sie größere Ausbeuten ergeben.

Mit den erhaltenen geringen Substanzmengen konnte ein vollständiger Strukturbeweis nicht erbracht werden. Es ist jedoch die Möglichkeit gegeben, Vergleiche mit dem bei der Photolyse erhaltenen Produkt I vorzunehmen und im Falle der Identität beider Verbindungen zu versuchen, mit dem Photolyse-Produkt noch weitere Hinweise für die Struktur zu erhalten.

c) Vergleiche der verschiedenen Benzpyrenyl-Guanin-Präparate

Anhand folgender Kriterien wurde das Endprodukt der Synthese mit dem Photolyseprodukt I (vergl. S. 12) verglichen:

1. Dünnschichtchromatographie	Kieselgel G; System: A,B,C
2. Papierelektrophorese	System: Wasser:Dimethylsulfoxyd 40:60 (Vol) pH 11,5 (0,01 m Na_2CO_3+NaOH)
3. UV-Spektren	vergl. Abbild. 5



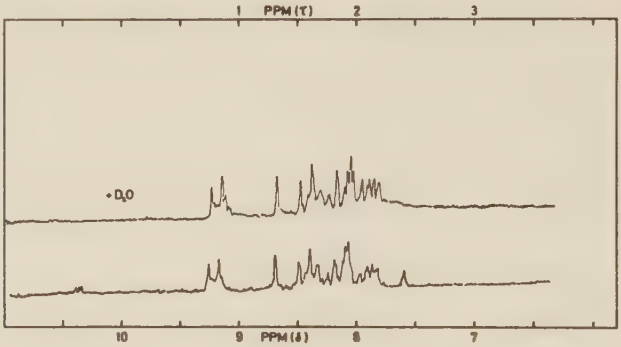
Abbild. 5 Absorptionskurve von 3,4-Benzpyrenyl-5-guanin-8 (3) in Äthanol
(λ_{max} 406, 388, 366, 348, 295, 283, 252 mu)

In diesen Kriterien stimmten beide Substanzen überein, so daß ihre Identität gesichert sein dürfte.

Damit ist es nun möglich, die jeweils von einer der beiden Substanzen erhaltenen Strukturhinweise auf beide Verbindungen zu beziehen, um so die gemeinsame Struktur beider Produkte so weit wie möglich sicherzustellen:

1. Die auf Seite 12 beschriebenen Beziehungen im chromatographischen Verhalten der Photolyseprodukte I und II deuten darauf hin, daß II das Benzpyrenylguanosin sein könnte, welches durch Zuckerabspaltung in das hypothetische Benzpyrenylguanin überführt werden kann.

2. Von dem Produkt I der Photolyse war mit einem NMR-Spektrum (Varian 100 mit Cat 1024) ein weiterer Strukturhinweis zu erhalten (vergl. Abbild. 6).



Abbild. 6 KMR-Spektrum von 3,4-Benzpyrenyl-5-guanin-8 (3) in Deuterodimethylsulfoxyd

Bei σ = 11,7 und bei σ = 6,18 findet man jeweils ein Signal, welches nach dem D_2O-Austausch nicht mehr auftritt. Bei einem Vergleich mit einem NMR-Spektrum des Guanosins sieht man, daß das schwache Signal bei σ = 11,7 dem Proton am N_1 (oder C_6-OH) und das Signal bei σ = 6,18 den beiden Protonen an der 2-Aminogruppe des durch Benzpyren substituierten Guanins zugeordnet werden kann. Die zahlreichen Signale im Bereich von σ = 7,7 bis σ = 9,4 entsprechen den Aromatenprotonen, die man auch bei anderen 5-substituierten Benzpyrenderivaten findet. Über die Art der Verknüpfung beider Ringsysteme ist in diesem Fall keine Aussage möglich, denn die zahlreichen Signale der Aromatenprotonen überdecken im Spektrum das Gebiet, in dem das Signal für das Guanin-Proton H_8 zu erwarten wäre; d.h. anders als bei einfachen Phenylsubstituenten am Puringerüst ist hier das Auftreten oder Fehlen des H_8-Signals nicht feststellbar. Da aber in der Synthese nur ein 8-Guanin-Derivat entstanden sein konnte, dürfte kaum mehr daran zu zweifeln sein, daß das Guanin bei den Bestrahlungsversuchen durch Benzpyren in 8-Stellung substituiert wird.

Die am Mononucleosid nachgewiesene Reaktion müßte auch an nativer oder denaturierter DNS ablaufen, wenn sie physiologische Folgen haben soll. Nach den Angaben von P.Ts'o [6], der solche Versuche mit radioaktiv markiertem Benzpyren ausgeführt hat, sind bei der UV-Bestrahlung so geringe Umsetzungen zu erwarten, daß ein Nachweis ohne radiochemische Methoden, die ich in unserem Institut nicht anwenden kann, kaum möglich ist. Aussichtsreicher erschien ein analoger Versuch, bei dem ich (nach P.Ts'o [6]) eine mit 3,4-Benzpyren gesättigte DNS-Lösung einer Röntgenbestrahlung (Dosis etwa 20 Kr) anstelle von UV-Licht ausgesetzt habe *. Nach der Abtrennung von nicht gebundenem Benzpyren wurde die so behandelte DNS enzymatisch zu den 5'-Nucleotiden abgebaut, da in dieser Form eine Abtrennung der unveränderten Nucleotide von den durch Benzpyren substituierten Nucleotiden möglich ist. Letztere kann man in einer nachfolgenden Säurehydrolyse in die entsprechenden substituierten Basen überführen. Wenn an der DNS analog zur Modellreaktion eine Arylierung des Guanins durch Benzpyren stattgefunden hat, so müßte jetzt im Reaktionsgemisch das 3,4-Benzpyrenyl-5-guanin-8 (3) - am sichersten im Pherogramm - nachzuweisen sein. Das aus dem oben beschriebenen Abbau und der nachfolgenden Säurehydrolyse erhaltene Reaktionsgemisch wurde mit dem Produkt I in der Papierelektrophorese verglichen (System: Natriumcarbonat-Puffer pH 11,5 H_2O:DMSO / 40:60 Vol.). Im UV-Licht zeigte sich dabei eine schwach blau fluoreszierende Zone, die den gleichen R_c-Wert wie das Vergleichsmaterial hatte.

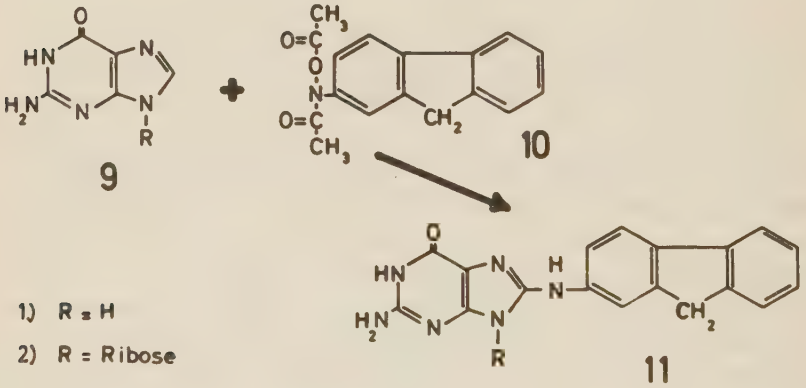
Damit ist ein Hinweis gegeben, daß die Adduktbildung zwischen Guanin und 3,4-Benzpyren auch in Polynucleotiden entsprechend der Modellreaktion verläuft. Ein exakter Beweis hierfür dürfte nur mit einem erheblichen experimentellen Aufwand, insbesondere unter Anwendung radiochemischer Methoden, möglich sein.

---

* Herrn Prof.Dr.Frischkorn und Herrn Dipl.phys.Rosenow von der radiologischen Abteilung der Universitäts-Frauenklinik Göttingen danke ich für die großzügige Hilfe bei der Ausführung der Bestrahlungen.

IV. Reaktion anderer cancerogener Verbindungen mit Guanin

Entsprechend den eingangs angedeuteten Überlegungen sollten neben dem 3,4-Benzpyren auch Cancerogene anderer Verbindungsklassen in der Lage sein, mit dem in der DNS enthaltenen Guanin zu reagieren. Diese Annahme fand während der Anfertigung dieser Arbeit eine teilweise Bestätigung durch die Befunde von E.Kriek und J.A.Miller [4], welche nachwiesen, daß N-acetoxy-N-acetaminofluoren mit Guanosin nach folgendem Schema reagiert.



Als wesentliches Ergebnis wird dabei hervorgehoben, daß damit die Bindung einer cancerogenen Substanz an Polynucleotide erfolgen kann, ohne daß dabei die Überstruktur der Makromoleküle verändert wird, wie es als Folge der 7-Alkylierung der in Polynucleotiden enthaltenen Purinbasen zu beobachten ist. [29]

Die Auswahl der Verbindungen, die in dieser Arbeit neben dem Benzpyren in Modellreaktionen untersucht werden sollten, wurde aufgrund folgender Überlegungen vorgenommen:

Für das 3,4-Benzpyren und andere Kohlenwasserstoffe ist es weitgehend gesichert, daß keine mehrstufige Metabolitbildung für die Cancerogenese erforderlich ist, denn die als Metabolite in Betracht kommenden Kohlenwasserstoffderivate zeigen fast

alle eine stark verminderte cancerogene Wirkung. Dementsprechend sind Modellreaktionen mit anderen Substanzen nur dann sinnvoll, wenn man auch für diese eine im einzelnen unbekannte Metabolitbildung als Voraussetzung für die cancerogene Wirkung weitgehend ausschließen kann.

Folgende Substanzen wurden ausgewählt; ausführlichere Begründungen hierfür werden zu Beginn der jeweiligen Abschnitte gegeben:

a) 1-Phenyl-3,3-dimethyltriazen
b) Diazomethan und N-methyl-N-nitroso-N-nitro-guanidin
c) Diazoessigester
d) 4-Hydroxylaminochinolin-N-oxyd

a) 1-Phenyl-3,3-dimethyltriazen

Diese Verbindung wurde von Druckrey [28] im Tierversuch als krebserregend befunden, als man prüfen wollte, ob außer mit den hauptsächlich untersuchten alkylierenden Substanzen auch mit arylierenden Verbindungen Tumore erzeugt werden können. Da man damit rechnen kann, daß in der Zelle die von Alkyl-Aryl-Triazenen allgemein bekannte säurekatalysierte Rückspaltung in Aryldiazoniumrest und Dialkylamin - im physiologischem Reaktionsmedium zwar verlangsamt - abläuft, sollte man in diesem Fall eine Arylierung des Guanins in 8-Stellung durch den Aryldiazoniumrest in vivo und vitro beobachten können.

Ich habe deshalb 1-Phenyl-3,3-dimethyltriazen synthetisiert [41] und mit Guanosin-2'-(3')-monophosphat in Tris-HCl-Puffer bei pH 7,4 versetzt, wobei als Lösungsvermittler Dimethylsulfoxyd oder Dimethylformamid dienten. Das Reaktionsgemisch verblieb 48 Stunden bei 37° C. In einer nachfolgenden Säurehydrolyse wurde das möglicherweise entstandene 8-Phenyl-guanosinmonophosphat in das 8-Phenylguanin überführt, da hiervon authentisches Vergleichsmaterial zur Verfügung stand. Der Identitätsnachweis wurde anhand der gleichen Kriterien vorgenommen, wie sie unter II (Seite 4) beschrieben wurden. Unter diesen Bedingungen konnte das erwartete 8-Phenylguanin sicher nachgewiesen werden.

b) Diazomethan und N-methyl-N-nitroso-N-nitro-guanidin

In den vergangenen Jahren konnte in zahlreichen Tierversuchen die cancerogene Wirkung von N-nitroso-N-alkylverbindungen, wie N-nitroso-N-alkylurethane, N-nitroso-N-alkylharnstoffe oder Dialkylnitrosamine nachgewiesen werden [29]. Dabei bewirkt die Struktur der N-alkylsubstituenten und der am Stickstoff gebundenen Acylreste, daß die Tumore jeweils nur in ganz bestimmten Organen der Versuchstiere entstehen [28]. Alle diese Verbindungen sind einerseits - klar erkennbar - Vorstufen für Diazoalkane (insbesondere Diazomethan), andererseits sind nahezu alle in der Lage, im Organismus Tumore zu erzeugen. Damit liegt die Vermutung nahe, daß bei der Cancerogenese die intermediäre Bildung von Diazoalkanen und deren Reaktion mit Nucleinsäuren notwendig ist. Ein eindeutiger Beweis für die Annahme der intermediären Bildung von Diazoalkanen als eigentlich cancerogene Argentien konnte bisher nicht erbracht werden; doch die Erzeugung von Lungentumoren in Versuchstieren, deren Atemluft mit Diazomethan versetzt war [30], und die cancerogene Wirkung von Diazoessigester sind als wesentliche Argumente für diese Hypothese anzusehen. Damit erscheinen aber weitere Untersuchungen mit Diazomethan durchaus sinnvoll.

Obwohl für das Diazomethan schon mehrfach [29] neben der oben beschriebenen 7-Alkylierung auch die Substitution am N_1 und die Methylierung des am C_6 stehenden Sauerstoffs im Guanin nachgewiesen wurden, ist noch nicht sichergestellt, ob dabei alle Reaktionsmöglichkeiten erfaßt sind. Es wäre denkbar, daß es entsprechend der oben beschriebenen Arylierung am C_8-Atom des Guanins auch eine Alkylierung an dieser Stelle möglich ist. Unabhängig von den Überlegungen zum Reaktionsmechanismus (vergl. S. 40) gibt es experimentelle Hinweise, die die Prüfung dieser Annahme rechtfertigen:

1. R. Schoenthal [31] konnte bei Einwirkung von radioaktiv markierten N-nitrosomethyl-urethan (C^{14}-Methylgruppe) auf DNS in vivo nach dem entsprechenden enzymatischen Abbau neben größeren Mengen 7-Methylguanin auch eine teilweise

Markierung des Guanins nachweisen. Die kontinuierliche Zunahme der Guaninmarkierung in Abhängigkeit von den Einwirkungszeiten des Agens in der Zelle deutete darauf hin, daß hier das C^{14} als C_1-Baustein während der de-novo-Synthese in das Guanin mit eingebaut wird. Bei den analogen Versuchen mit DNS in vitro war nach dem enzymatischen Abbau in der Guaninfraktion aber auch eine gut erkennbare Menge einer radioaktiv markierten Verbindung enthalten. Diesmal ist die Erklärung der Markierung über die de-novo-Synthese nicht mehr möglich. Recht unwahrscheinlich ist auch die Annahme, daß es sich hierbei um das N_1-Methyl-Guanin oder das 6-Methoxyl-Guanin handeln könnte, denn beide lassen sich wegen der veränderten pK-Werte am Ionenaustauscher vom Guanin abtrennen. Dagegen verhalten sich Guanin und 8-Methyl-Guanin im Chromatogramm und Pherogramm so ähnlich, daß man das Auftreten von möglicherweise entstandenem 8-Methyl-Guanin in der Guaninfraktion bei der Austauscherchromatographie leicht übersehen kann.

2. Den oben beschriebenen Versuchen von R.Schoenthal [31] entsprechend haben B.Singer und H.Fraenkel-Conrat [32] N-nitroso-N-methyl-N-nitro-guanidin * (NMNG) mit Polynucleotiden umgesetzt, wobei neben den bekannten Alkylierungsprodukten des Guanins ein strukturell unbekanntes Produkt isoliert wurde, welches dem Guanin sowohl im UV-Spektrum als auch im Chromatogramm sehr ähnlich ist. Auch hierbei ist nicht auszuschließen, daß es sich um das 8-Methyl-Guanin handeln könnte.

Damit erschien sowohl die Wiederholung von Versuchen mit Diazomethan als auch ein zunächst orientierender Versuch mit NMNG durchaus sinnvoll. In Anlehnung an die Versuche von M.Freedman [33] wurde Guanosin-2'-(3')-monophosphat, gelöst in einer Mischung aus Wasser und Methanol 2:1, mit einer ätherischen

---

* Im folgenden mit NMNG abgekürzt.

Diazomethanlösung versetzt und bei 0-5° C über mehrere Tage belassen. Im Abstand von 8-10 Stunden wurde frische Diazomethan-Lösung zum Reaktionsgemisch zugegeben. In einer nachfolgenden Säurehydrolyse (1n HCl; 30 Minuten 100° C) sollte von allen in Nucleotid- oder Nucleosid-form vorliegenden Guaninderivaten die Zuckerphosphatreste abgespalten werden, wobei etwa vorhandenes 8-Methylguanosin-monophosphat in 8-Methyl-Guanin überführt wird. Bei der Auftrennung des Reaktionsgemisches zeigte sich im Pherogramm neben den im UV-Licht z. T. blau fluoreszierenden Zonen eine UV-absorbierende Zone (254 mμ), die den gleichen R_c-Wert wie authentisches 8-Methyl-Guanin aufweist. Auch im Papierchromatogramm und im Dünnschichtchromatogramm konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Die relativ kleinen Produktmengen lassen jedoch ohne Anwendung radiochemischer Methoden keine Aussage zu, wie groß der Anteil der 8-Alkylierung verglichen mit dem Gesamtumsatz des Guanins ist.

Bei der Umsetzung des N-methyl-N-nitroso-N-nitro-guanidins - anstelle von Diazomethan - mit Polynucleotiden habe ich mich auf Vorversuche beschränkt, da diese Reaktion von H.Fraenkel-Conrat noch intensiv bearbeitet wird. Ich habe lediglich Hefe-RNS in einer Mischung von Dimethylformamid-Wasser (1:4 Vol.) mit NMNG mehrere Tage bei 37° C belassen. Nach einer anschliessenden Säurehydrolyse wurde das gesamte Reaktionsgemisch in der Papierelektrophorese aufgetrennt und mit 8-Methyl-Guanin verglichen. Im Pherogramm war dabei eine sehr dünne Zone (UV_{254}-absorbierend) zu erkennen, die den gleichen R_c-Wert aufweist wie das 8-Methyl-Guanin. Da von den anderen Autoren keine näheren Angaben über das von ihnen genannte strukturell unbekannte Produkt vorliegen, sind zur möglichen Identität dieser Substanz mit 8-Methyl-Guanin keine Aussagen möglich, so daß dieser hier beschriebene Versuch nur einen Hinweis darauf ergibt, daß NMNG mit Guanin auch zu 8-Methyl-Guanin zu reagieren vermag.

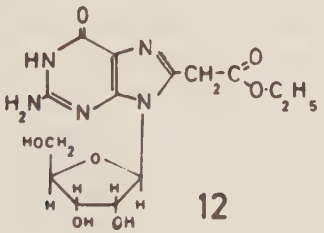
c) Diazoessigester

Modellreaktionen mit dieser Verbindung erscheinen aus zwei Gründen zweckmäßig:

1. Es ist sehr unwahrscheinlich, daß für die cancerogene Wirkung eine vorherige Umwandlung in aktive Metabolite erforderlich sein sollte.

2. Wenn sich mit Diazoessigester eine Alkylierung des Guanins in 8-Stellung erreichen läßt, so wäre dies eine recht gute Stütze für die Hypothese, nach der in der Zelle intermediär auftretende Diazoalkane für die Cancerogenese eine wichtige Rolle spielen.

Diesen Überlegungen zufolge war also zu prüfen, ob man nach der Reaktion von Diazoessigester mit Guanosin den Guanosin-8-essigsäureäthylester nachweisen kann (vergl. Formel).



12

Entsprechende Versuche scheiterten jedoch bisher an der relativ hohen Beständigkeit des Diazoessigesters, wodurch man einen so geringen Gesamtumsatz an Guanin erreicht, daß die Identifizierung eines einzelnen Produkts ohne radiochemische Methoden nicht möglich ist. Da mit Diazoessigester ausschließlich Hautkrebs erzeugt werden kann, ist nicht auszuschließen, daß hier Photoreaktionen eine aktivierenden Einfluß haben könnten, so daß eine Photolyse des Diazoessigesters in Gegenwart von Guanosin nicht völlig unbegründet erschien. Den Erwartungen entsprechend findet man bei solchen Versuchen eine wesentliche

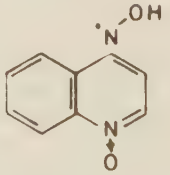
Zunahme an Reaktionsprodukten. Bei ihrer elektrophoretischen Auftrennung zeigen sich zwar zahlreiche im UV-Licht blau fluoreszierende Substanzen, von denen aber keine eindeutig als Guanin-8-essigsäureäthylester zu identifizieren war. Damit ist in dieser Modellreaktion ein sicherer Nachweis der 8-Alkylierung des Guanins vorerst nicht möglich.

d) 4-Hydroxylaminochinolin-N-oxyd

Aus früheren Arbeiten [34] ist bekannt, daß 4-Hydroxylaminochinolin-N-oxyd * (HANO) als Metabolit des 4-Nitrochinolin-N-oxyds in der Zelle auftritt und in dieser Form sehr viel stärker krebserregend ist als die Nitroverbindung, die in der Zelle offenbar erst enzymatisch in die Hydroxylaminoverbindung umgewandelt wird. Versuche in vivo [5] ergaben später, daß HANO kovalent an die DNS gebunden werden kann. In entsprechenden Modellversuchen mit DNS ließ sich eine solche kovalente Bindung bisher nicht zeigen [5], was aber möglicherweise durch ungünstige Reaktionsbedingungen in diesen Versuchen zu erklären ist.

Ein wesentlicher Grund dafür, im Rahmen dieser Arbeit einige Versuche mit HANO zu unternehmen, bestand darin, daß N.Kataoka et al. [35] in Lösungen von HANO anhand von ESR-Messungen freie Radikale nachweisen konnten.

Aufgrund quantenmechanischer Berechnungen gaben die Autoren als wahrscheinlichste Radikalstruktur folgende Formel an:



13

* Im folgenden mit HANO abgekürzt.

Trotz einiger struktureller Unterschiede zu anderen cancerogenen N-hydroxyverbindungen ist es gut möglich, daß HANO mit Guanin in Polynucleotiden analog der von E.Kriek und J.A.Miller [4] beschriebenen "Arylamidation" reagiert. Zur experimentellen Klärung dieser Frage wäre das gleiche Vorgehen wie beim Benzpyren oder bei den anderen Modellreaktionen erforderlich gewesen; d.h. Versuch einer Umsetzung des Guanosins mit HANO, Isolierung eines Addukts und schließlich die Synthese des durch HANO in 8-Stellung substituierten Guanins als authentisches Vergleichsmaterial.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte jedoch nur geprüft werden, ob HANO-Reaktionen mit dem Guanosin überhaupt beobachtet werden können. Hierfür wurde HANO nach dem Verfahren von E.Ochiai [36] hergestellt und mit Guanosin-2'-(3')-monophosphat in Tris-Puffer bei 37° mehrere Tage stehen gelassen. Bei der elektrophoretischen Auftrennung dieser Reaktionslösung findet man im Vergleich mit einem Kontrollversuch keine Zone, die als Reaktionsprodukt aus Base und HANO anzusehen wäre. Sowohl im Reaktionsgemisch als auch im Kontrollversuch ohne Base tritt neben wenig Ausgangsprodukt eine im UV-Licht orange fluoreszierende Zone auf, was zu der Annahme führte, daß die Hydroxylaminoverbindung während der langen Reaktionszeit durch Luftsauerstoff zum entsprechenden Azoxyderivat oxydiert wird. Um diese Nebenreaktion zu verhindern, wurde die Umsetzung unter Stickstoff im schwach reduzierenden Medium (0,1 mg/m Natriumdithionit) wiederholt. Diesmal ließ sich nach Säurehydrolyse im Pherogramm eine gelbgrün fluoreszierende Zone nachweisen, die im entsprechenden Kontrollversuch nicht auftritt. Aus einem analogen Versuch, bei dem HANO mit Kalbsthymus-DNS (Fa. Sigma) analog der Modellreaktion in Tris-HCl-Puffer (pH 7,4) umgesetzt wurde, konnte nach weitgehender Entfernung von nicht gebundenem HANO und enzymatischem Abbau mit anschließender Säurehydrolyse der DNS-über die 5'-Nucleotide zu den freien Basen-im Pherogramm ebenfalls die oben beschriebene gelbgrün fluoreszierende Substanz - wenn auch in geringer Menge - nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse gestatten zwar keine Aussagen zur Struktur eines Addukts aus Guanin und 4-Hydroxylaminochinolin-N-oxyd, doch zeigen sie, daß offenbar auch hier eine Adduktbildung erfolgt, wodurch eine spätere Bearbeitung entsprechend den anderen Modellreaktionen gerechtfertigt erscheint.

V. Diskussion

Die vorliegenden Experimente deuten darauf hin, daß die ausgewählten Vertreter der verschiedenen Verbindungsgruppen cancerogener Substanzen wie vermutet mit dem in Polynucleotiden enthaltenen Guanin in 8-Stellung zu reagieren vermögen. Wenn auch endgültige Aussagen aufgrund des vorliegenden experimentellen Materials noch nicht möglich sind, soll im folgenden,nach einer Diskussion der einzelnen Modellreaktionen,noch erwogen werden, welche Konsequenzen diese Reaktion sowohl für die Struktur als auch für die Funktion der DNS haben kann.

A. Zu den einzelnen Modellreaktionen

a) polycyclische Kohlenwasserstoffe - Benzpyren

3,4-Benzpyren kann mit Guanin in der vermuteten Weise zum 3,4-Benzpyren-5-guanin-8 (3) reagieren. Zwar entspricht die Photo- oder Röntgenaktivierung des Kohlenwasserstoffs nicht den physiologischen Verhältnissen, doch diese Bestrahlungen sollten nur ein Mittel zur Radikalerzeugung sein, um so zunächst zu klären, ob die oben genannte Reaktion überhaupt abläuft. Insbesondere bei der Röntgenaktivierung ist zu erwarten, daß infolge der hohen Energieeinstrahlung auch nichtcancerogene polycyclische Kohlenwasserstoffe Radikale ergeben, die dann ebenso mit dem Guanin reagieren können, was von P.Ts'o [37] auch gefunden wurde.

Mit dieser 8-Substitution ist zunächst prinzipiell eine Möglichkeit aufgezeigt, wie ein polycyclischer Kohlenwasserstoff kovalent an die Basen in Polynucleotiden gebunden werden kann, wobei die Frage nach der Herkunft von Neutralradikalen in der Zelle zunächst unberücksichtigt bleiben soll.

Betrachtet man im Vergleich dazu die bisher mit der "Jod-Reaktion" gewonnenen Ergebnisse von E.Wilk [18], so sieht man, daß über Radikal-Kationen zwar auch eine kovalente Bindung polycyclischer Kohlenwasserstoffe an Nucleinsäurebasen erfolgen kann, aber die Substituionsart ist dabei völlig anders. Als

Folge des elektrophilen Angriffs der Radikal-Kationen an N-heterocyclen erhält man in Übereinstimmung mit der Theorie hauptsächlich N-Benzpyrenylverbindungen. Auf die Purinbasen in Nucleinsäuren bezogen, folgt daraus die Quarternisierung des N_7-Atoms im Puringerüst, analog den bekannten Alkylierungsreaktionen am Guanin. Von diesen ist bekannt [29], daß es dabei zu einer Lockerung der N-Glykosidbindung mit nachfolgender Abspaltung der Basen kommen kann, woraus sich in vivo Mutationen ergeben können.

Unter der Voraussetzung, daß die Bindung des Benzpyrens in vivo auch in 8-Stellung des Guanins oder anderer Purinbasen nachgewiesen wird, ergeben sich noch folgende Fragen:

1. Ist in der Zelle die Bildung von Benzpyrenradikalen als Voraussetzung für die 8-Substitution analog der Modellreaktion möglich?
2. Warum sind nur ganz bestimmte polycyclische Kohlenwasserstoffe cancerogen?

Zu 1. Nach J.A.V.Butler und H.F.Park [12] kann man durchaus annehmen, daß Kohlenwasserstoffe wie z.B. das Benzpyren in der Zelle in Radikalketten mit einbezogen werden und daß dabei auch Neutralradikale entstehen, die dann das in Nucleinsäuren enthaltene Guanin in 8-Stellung substituieren.

Weiterhin ist es denkbar, daß Radikal-Kationen, die analog der Wilk'schen "Jod-Reaktion" auch in der Zelle entstehen könnten, durch Abstraktion eines Protons (vergl. H.F.Park [12]) in Neutralradikale übergehen, die zur 8-Substitution befähigt sein sollten. Darüber hinaus ist als Nebenreaktion der N_7-Quarternisierung eine elektrophile Substitution des Guanins in 8-Stellung durch Benzpyren-Radikal-Kationen nicht auszuschließen. Dies erscheint durchaus verständlich, wenn man berücksichtigt, daß besonders die Guaninbase auch in 8-Stellung elektrophil substituierbar ist [7].

Zu 2. Nimmt man entsprechend den vorhergehenden Überlegungen an, daß Neutral-Radikale für die 8-Substitution erforderlich sind, so wäre die Neigung der Kohlenwasserstoffe zur Bildung solcher Radikale im Verlaufe einer Radikal-Kette das Differenzierungskriterium für cancerogene und nichtcancerogene Kohlenwasserstoffe.

Wird dagegen als Primärschritt die Radikal-Kationenbildung - unabhängig von den weiteren Reaktionen solcher Teilchen - angenommen, so muß man erwarten, daß cancerogene Kohlenwasserstoffe leichter Radikal-Kationen bilden als andere polycyclische Kohlenwasserstoffe. Für diese Annahme geben die Experimente von E.Wilk [18] und der Nachweis einer Korrelation zwischen Elektronendonatorstärke und cancerogener Wirkung solcher Verbindungen durch A.C.Allison [39] einige Hinweise. In diesem Zusammenhang ist es notwendig zu erwähnen, daß alle anderen Versuche, Korrelationen zwischen cancerogener Wirkung und chemischer Struktur unter Berücksichtigung sterischer Eigenschaften der Kohlenwasserstoffe, als gescheitert anzusehen sind, weil sie stets zu Widersprüchen geführt haben.

b) alkylierende Agentien - Diazomethan

Die hier beschriebenen Versuche mit Diazomethan und mit N-nitroso-N-methyl-N-nitro-guanidin (NMNG) können keinesfalls zur vollständigen Klärung der zahlreichen Fragen dienen, die sich bei Experimenten mit alkylierenden Substanzen bisher ergeben haben. Aus einer in der Literatur erschienenen Zusammenfassung der bisher vorliegenden Ergebnisse von Experimenten mit N-nitrosoverbindungen [29] kann man jedoch ersehen, daß in vivo auf jeden Fall eine Umwandlung dieser Substanzen in aktive Zwischenprodukte erfolgen wird, wobei die Annahme der Bildung von Diazoalkanen als aktive Intermediärprodukte noch die beste Erklärung für die verschiedenen Ergebnisse liefert. Mit Nucleinsäuren reagieren die Diazoalkane, genau wie andere alkylierende Agentien, bevorzugt unter Quarternisierung des N_7-Atoms der Purinbasen. Wie schon im vorangehenden Abschnitt diskutiert wurde,

findet man mit dieser Reaktion und ihren Folgen zwar eine Erklärung für Mutationen aber keine verständliche Deutung für die Cancerogenese. Unter diesem Gesichtspunkt kann die hier im Modellversuch nachgewiesene 8-Alkylierung des Guanosins, bzw. des Nucleotids, einige Bedeutung erlangen, denn mit dieser und der bekannten 7-Alkylierung hätte man zwei Reaktionswege, die den beiden unterschiedlichen Wirkungen im Organismus zugeordnet werden könnten.

Zur Frage, wie es überhaupt zu der beobachteten 8-Alkylierung durch Diazomethan kommen kann, müssen folgende Reaktionsmöglichkeiten in Betracht gezogen werden:

1. Das Diazomethan zerfällt in der bekannten Weise in Stickstoff und Carbonium-Ion, welches hauptsächlich am N_7-Atom des Puringerüsts angreift, während als Nebenreaktion auch ein elektrophiler Angriff am C_8-Atom erfolgen kann, so wie es im vorangehenden Abschnitt für das Radikal-Kation des Benzpyrens diskutiert wurde.

2. Im Verlaufe einer Radikal-Kette zerfällt das Diazomethan nicht nur in Carbonium-Ion und Stickstoff, sondern es werden auch Neutral-Radikale ($CH_3^{\bullet}$) gebildet, die dann am C_8 des Guanins angreifen können (vergl. R.O.C.Norman; G.K.Radda [40]).

Die unter 2. aufgeführte Erklärung ist für den hier betrachteten Modellversuch insofern bedenklich, da man höchstens bei einer Photolyse des Diazomethans die Bildung solcher CH_3-Radikale diskutieren könnte. In vivo wäre diese Erklärung jedoch nicht völlig auszuschließen, da in der Zelle Radikalketten, in die das Diazomethan mit einbezogen werden könnte, durchaus zu erwarten sind. Auch die cancerogene Wirkung von Azoäthan [28] liefert einen guten Hinweis auf einen solchen Radikalmechanismus, denn bei dieser Verbindung kann man den spontanen Zerfall in Stickstoff und C_2H_5-Radikale selbst unter physiologischen Bedingungen als Hauptreaktion annehmen. Im Hinblick auf andere alkylierende cancerogene Substanzen wie N-Lost-Verbindungen

und besonders Epoxyde ist die Annahme eines Radikalmechanismus ebenfalls möglich, denn schon von J.A.V.Butler [38] wurde darauf hingewiesen, daß man von den aus obigen Verbindungen entstehenden Carbonium-Ionen Grenzstrukturen in Form von Diradikalen formulieren kann, die neben den bekannten elektrophilen Substitutionen der Carbonium-Ionen auch andere Reaktionen erklären würden. Die gewonnenen experimentellen Ergebnisse und die sich hieran anschließenden Überlegungen zeigen somit, daß alkylierende cancerogene Agentien offenbar in gleicher Weise wie cancerogene polycyclische Kohlenwasserstoffe mit den in Polynucleotiden enthaltenen Purinbasen sowohl am N_7 als auch am C_8 zu reagieren vermögen. Wenn auch diese Reaktionen erstmals ein gemeinsames chemisches Verhalten der cancerogenen polycyclischen Kohlenwasserstoffe und alkylierenden Agentien aufzeigen, so können die Modellreaktionen mit Diazomethan und NMNG zunächst nur als Hinweise auf solche Reaktionsmöglichkeiten in vivo dienen.

c) Phenyl-dimethyl-triazen

Bei Annahme der auf Seite 28 diskutierten Spaltung dieser Verbindung in Aryldiazonium-Rest und Dialkylamin ist eine Analogie zu der schon früher untersuchten Arylierung von Purinnucleosiden und Nucleotiden [7] sehr naheliegend. Die Bedingungen, unter denen diese Arylierung bisher nachgewiesen wurde, lassen erwarten, daß diese Reaktion in gleicher Weise wie im Modellversuch auch in vivo ablaufen kann.

d) 4-Hydroxylaminochinolin-N-oxyd

Die geschilderten Versuche lassen nur wenige Schlüsse darüber zu, was bei der Umsetzung mit dem Guanin im einzelnen geschieht. Allein aufgrund der Struktur des cancerogenen Chinolinderivats könnte man erwarten, daß es sich hier um einen Sonderfall der cancerogenen N-alkyl-N-hydroxyl-arylamine handelt, die unter Umständen nach der von E.Kriek und J.A.Miller [4] beschriebenen "Arylamidation" mit Guanin reagieren könnten.

B. Zur Auswirkung der gefundenen Reaktionen auf die Struktur und Funktion der DNS

Unter der Voraussetzung, daß sich die hier in einzelnen Modellreaktionen gezeigte 8-Substitution des in Polynucleotiden enthaltenen Guanins auch in vivo als allgemeine Reaktion cancerogener Verbindungen nachweisen läßt, kann man folgende Fragen diskutieren:

1. Kann die Substitution in 8-Stellung des Guanins die Struktur der DNS entscheidend verändern?
2. Welche Bedeutung können diese Veränderungen für die Funktion der DNS in der Zelle haben?

Zu 1. Die 8-Substitution am Guanin wird zwar zu deutlichen sterischen Veränderungen am DNS-Strang führen, aber es wird nicht zu einem Zerfall der Überstruktur kommen, wie es bei den verschiedenen Alkylierungsreaktionen am N_7-Atom des Guanins als Folge der Herauslösung einzelner Basen aus einer Kette [29] zu beobachten ist. Selbst an den Wasserstoffbrückenbindungen eines 8-substituierten Guanins zu dem Cytosin des Komplementärstrangs sind keine Veränderungen zu erwarten, so daß es bei der Replikation einer so veränderten DNS nicht zur Fehlpaarung des Guanins mit anderen Basen als Cytosin kommen dürfte.

Zu 2. Für diese Frage muß man die beiden Grundfunktionen der DNS einer Zelle in Betracht ziehen. Einmal steuert sie im Rahmen der Proteinbiosynthese alle wesentlichen Stoffwechselvorgänge direkt oder indirekt, und andererseits überträgt die DNS einer Zelle ihre genetische Information vollständig auf zwei Tochterzellen. Zur Erfüllung der erstgenannten Aufgabe ist eine ungehinderte Funktion der DNS-abhängigen RNS-Synthese, d.h. des Transskriptionsprozesses, als Anfangsschritt der Proteinbiosynthese erforderlich. Wenn sich hierbei aber die 8-Substitution am Guanin schwerwiegend in Form einer Hemmung auswirken würde, so hätte man einen dem Actinomycin ähnlichen Effekt der

Cancerogene zu erwarten. Zieht man nun die zufällige Veränderung von bestimmten Repressorgenen durch die oben beschriebene Reaktion in Betracht, durch welche die Synthese von Repressormolekülen gehemmt werden könnte, so würde durch einen Mangel an diesen Molekülen die Genaktivität ständig unverändert aufrecht erhalten bleiben, womit der Ausfall der Wachstumskontrolle erklärt werden könnte. Dabei wird aber vorausgesetzt, daß sehr wenige Substituenten den Ausfall eines bestimmten Genabschnitts hervorrufen können, während andere Gene kaum geschädigt werden.

Für die zweite oben genannte Aufgabe der DNS ist eine ungehinderte Funktion des DNS-Replikations-Systems, d. h. der DNS-Polymerase, erforderlich. Nimmt man nun an, daß die DNS-Polymerase während einer Replikation durch solche Substituenten am Guanin in ihrer Funktion gestört wird - d. h. daß die Replikation verlangsamt oder völlig unterbunden wird - so müßte daraus eine Verlangsamung oder Hemmung der Zellvermehrung folgen, was offensichtlich in der Tumorzelle nicht der Fall ist. Nimmt man dagegen an, daß die gesamte Replikation ungehindert abläuft, so bleibt als Alternative eine Störung der Repressorbindung am Operatorgan einer für die Wachstumskontrolle notwendigen Enzymkette nach beendeter Replikation, so daß die Polymerase erneut in Aktion treten kann. Dies aber hätte den gleichen Effekt wie der oben diskutierte Ausfall der Repressorsynthese und gäbe eine ebenso verständliche Erklärung zu der Frage, warum es durch cancerogene Verbindungen in einer Zelle zu einem Verlust der Wachstumskontrolle kommt.

VI. Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Es konnte gezeigt werden, daß die Arylierung des Guanosins durch Diazoniumsalze über Arylradikale analog der Gomberg-Bachmann-Reaktion verläuft.

2. Mehrere Modellreaktionen wurden ausgeführt, um zu prüfen, ob cancerogene Verbindungen allgemein dazu befähigt sind, das in Nucleinsäuren enthaltene Guanin in 8-Stellung zu substituieren.

   Dabei wurde nachgewiesen, daß 3,4-Benzpyren mit Guanin zu 3,4-Benzpyrenyl-5-guanin-8 reagieren kann. Darüber hinaus wurden erste Hinweise erhalten, daß die gleiche Reaktion auch mit dem in DNS gebundenen Guanin möglich ist. Ferner konnte gezeigt werden, daß 1-Phenyl-3,3-dimethyl-triazen mit Guanosin zu 8-Phenylguanosin reagiert und daß bei Einwirkung von Diazomethan auf Guanosinmonophosphat neben den bekannten Alkylierungsprodukten auch 8-Methyl-guanosinmonophosphat entsteht. Aus einigen Vorversuchen ist zu entnehmen, daß auch 4-Hydroxylaminochinolin-N-oxyd mit Guaninnucleotiden zu reagieren vermag.

3. Die Ergebnisse werden abschließend im Hinblick auf die Frage nach dem Primärschritt der Cancerogenese diskutiert.

VII. Beschreibung der Versuche

Vorbemerkungen zu den Versuchen und angewandten Arbeitsmethoden

1. Für die Papierchromatographie wurde das Papier Nr. 1 der Fa. Whatman verwendet.
2. Das für die präparative Dünnschichtchromatographie benötigte Kieselgel war Kieselgel G der Fa. Merck. Es wurden hierfür 45 x 20 cm große Glasplatten verwendet. Die Schichtdicke betrug 3,5 mm; es wurde jeweils 3 Std. bei 125° C aktiviert. Von den entwickelten Platten wurden die Zonen jeweils abgekratzt, in einem Lösungsmittel (häufig Äthanol) suspendiert, für 5 Minuten mit Ultraschall (Sonifier Fa. Branson) behandelt und dann für 4 bis 6 Stunden geschüttelt (im Dunkelraum). Anschließend wurde das Kieselgel abzentrifugiert und in frischem Lösungsmittel suspendiert, erneut mehrere Stunden geschüttelt und abzentrifugiert. Aus den Überständen der Zentrifugationen wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand in einem möglichst unpolaren Lösungsmittel aufgenommen, wobei noch etwas Kieselgel zurückblieb. Aus diesen Lösungen kann man dann die Substanzen frei von Kieselgel erhalten.
   Dieses Verfahren ist erforderlich, da fast alle Benzpyrenderivate bei dem sonst üblichen Extraktionsverfahren nach Soxhlet leicht oxydiert werden.
3. Alle Absorptionsspektren wurden mit dem Spektralphotometer Beckman DB G der Fa. Beckman gemessen. Die Extinktionskoeffizienten und die Lage der Absorptionsmaxima sind mit dem Spektralphotometer PMQ II der Fa. Zeiss nachkontrolliert.
4. Die Schmelzpunkte sind im Kofler-Schmelzpunktsgerät bestimmt und korregiert.
5. Die analytische Papierelektrophorese wurde im Pherograph "Original Frankfurt" der Fa. Hornung und Vetter durchgeführt. Als Trägermaterial benutzte ich das Papier 2112 der Fa. Macherey und Nagel. Die Bogen hatten einen durchschnittlichen Feuchtigkeitsgehalt von 120 %, bezogen auf das Trocken-

gewicht eines Bogens. Die angelegten Spannungen lagen zwischen 2500 und 2700 V. Da die R_c-Werte stark von der Ionenstärke der aufgetragenen Probelösungen beeinflußt werden, muß bei den Vergleichsversuchen immer die Probelösung, die Vergleichslösung und eine Mischung beider Lösungen aufgetragen werden. Zeigen sich dabei geringe Unterschiede der R_c-Werte zwischen den Zonen der Probelösung und denen der Vergleichslösung, die bei der Mischung beider Lösungen nicht mehr auftreten, so ist damit sichergestellt, daß die geringen Unterschiede nur auf unterschiedlicher Ionenstärke der zu vergleichenden Lösungen beruhen.

Pufferlösungen

Im Text wird sowohl die Art des Puffers als auch dessen pH-Wert genannt. Die genaue Zubereitung wird hier beschrieben.

1. Natriumcarbonat-Puffer pH 11,9
   Jeweils 5 Liter einer wässrigen 0,01 m Sodalösung werden am pH-Meter durch Zugabe von 1 n Natronlauge auf den gewünschten pH-Wert gebracht.
2. Natriumcarbonat-Puffer pH 10,5
   Jeweils 5 Liter einer wässrigen 0,01 m Sodalösung werden am pH-Meter durch Zugabe von Eisessig auf den gewünschten pH-Wert gebracht.
3. DMSO-Natriumcarbonat-Puffer pH 11,5
   Jeweils 1,2 Liter einer wässrigen Sodalösung werden mit 1,8 Liter Dimethylsulfoxyd gemischt, so daß die Endkonzentration an Soda 0,01 Mol/Liter beträgt. Am pH-Meter wird diese Lösung mit 1 n Natronlauge auf den gewünschten pH-Wert gebracht.

Reaktion des N-nitroso-acetanilids mit Guanosin-2'-(3')-monophosphat

100 mg N-nitroso-acetanilid (Houben-Weyl 10/3 S. 68) werden in eine Lösung von 70 mg Guanosin-2'-(3')-monophosphat (Fa.Sigma) in 35 ccm 0,01 m Tris-HCl-Puffer (pH 7,8) und 5 ccm Dimethylformamid gegeben. Diese Lösung beläßt man für 36 Stunden bei 37° C im Thermostaten. Anschließend wird diese Reaktionslösung im Ölvakuum bis zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 5 ccm 1 n Salzsäure aufgenommen und in dieser Lösung 1 Stunde lang am Rückfluß erhitzt. Zur Entfernung der Salzsäure wird das Hydrolysat dreimal mit 15 ccm Wasser am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeengt. Im Anschluß daran wird der Rückstand im Elektrophorese-Puffer (Natriumcarbonat-Puffer pH 11,5) aufgenommen und auf der Papierelektrophorese (vergl. S. 45) mit synthetischem 8-Phenylguanin verglichen. Nach 12 Stunden Laufzeit (bei 2700 V = 85 V/cm) sieht man in etwa 4 cm Entfernung vom Start sowohl im Reaktionsgemisch als auch im Vergleich die hellblau fluoreszierende Zone des 8-Phenylguanins.

Beschreibung der Bestrahlungsversuche und Aufarbeitung der dabei erhaltenen Reaktionslösungen

In eine 4 proz. wässrige Natriumdodecylsulfatlösung (neutral oder 0,1 n NaOH) gibt man jeweils soviel Guanin oder Guanosin hinzu, daß die Lösung 0,03 Mol Base pro Liter Lösung enthält. Anschließend wird 48 Stunden lang mit einer Quecksilbertauchlampe (QS 81 Fa. Quarzlampengesellschaft Hanau) unter Vorschaltung eines Pyrex-Glasfilters bestrahlt. Die hierauf gelb gefärbte Reaktionslösung wird zunächst in 70 ccm Portionen lyophylisiert und den feinverteilten Rückstand löst man in möglichst wenig heißem Alkohol auf, wobei der größte Teil des Guanins oder Guanosins ungelöst zurückbleibt. Beim Abkühlen der alkoholischen Lösung auf -25° C fällt ein großer Teil des Natriumdodecylsulfats als weißer amorpher Niederschlag aus, der mit einem gekühlten Büchner-Trichter abgesaugt wird. Das Filtrat

wird in mehreren Stufen jeweils auf die Hälfte des ursprünglichen Volumens eingeengt und erneut abgekühlt, wonach man jeweils ausgefallenen Natriumdodecylsulfat abfiltriert. Aus dem Filtrat der letzten Fällungsstufe, welches kein größeres Volumen als 40 ccm haben sollte, werden am Ionenaustauscher Dowex 1 X8 die letzten Reste des Dodecylsulfats entfernt. (Elutionsmittel Äthanol; Austauscher in Cl -Form). Das im Eluat dieser Trennung (Elutionsdiagramm siehe S. 8) enthaltene Kochsalz fällt beim Einengen der Lösungen aus.

Aus den so erhaltenen Reaktionslösungen werden die im Text mit I (3,4-Benzpyrenyl-5-guanin-8) und II (3,4-Benzpyrenyl-5-guanosin-8) bezeichneten Produkte durch präparative Dünnschichtchromatographie als hellgelbe amorphe Pulver isoliert (vergl. Chromatogramm S. 10).

Überführung von Produkt II in I

Mit einer Probe der Verbindung II wird die Orcinreaktion nach W.Mejbaum [25] ausgeführt, wobei die für Pentosen charakteristische Grünfärbung auftritt. Eine zweite Probe der Substanz II wird mit 5 ccm 1 n HCl 15 Minuten lang am Rückfluß erhitzt. Anschließend wird die Salzsäure am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in Alkohol aufgenommen. In dieser Lösung ist dann durch dünnchromatischen Vergleich (System: A;B vergl.S.8) das Produkt I nachzuweisen. Mit dieser Probe verläuft die Orcinreaktion negativ.

Oxydationsversuch zur Überführung des 3,4-Benzpyren-5-aldehyds in die 3,4-Benzpyren-5-carbonsäure

50 mg 3,4-Benzpyren-5-aldehyd (synthetisiert nach L.F.Fieser [23]) werden in 45 ccm äthanolischer KOH (0,1 n) gelöst und unter Kühlung mit 3 ccm 30 proz. H_2O_2-Lösung versetzt. Dieses Gemisch wird anschließend 4 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt. Nach dieser Zeit ist nur noch wenig Aldehyd dünnschichtchromatographisch nachzuweisen. Im gleichen Chromatogramm (Kieselgel G

System: C vergl. S. 8) ist eine blau fluoreszierende Zone (R_f 0,7) neben zahlreichen blaugrün fluoreszierenden Zonen (R_f 0,1-0,3) zu erkennen.

Verseifung des 3,4-Benzpyren-10-nitrils

30 mg des Nitrils (aus dem Nachlaß von A.Windaus) werden im Bombenrohr mit 70 ccm konz. HCl 4 Stunden lang auf 160-180° C erhitzt. Im Anschluß daran wird die Salzsäure durch mehrmaliges Abdampfen der Lösung mit Wasser am Rotationsverdampfer entfernt und der gelbe Rückstand in Äthanol aufgenommen. Im Dünnschichtchromatogramm dieser Lösung (Kieselgel G; System: C vergl. S. 8) ist neben wenig Ausgangsprodukt und 3,4-Benzpyren die blau fluoreszierende Zone der 3,4-Benzpyren-10-carbonsäure (R_f 0,7) durch Vergleich mit authentischem Material nachzuweisen.

3,4-Benzpyren-5-carbonsäure

500 mg 3,4-Benzpyren werden in 6 ccm trockenem Nitrobenzol gelöst, mit 2 ccm frisch destilliertem Oxalylchlorid versetzt und unter einem stetigen Stickstoffstrom innerhalb einer Stunde vorsichtig auf 120° C erhitzt (Ölbad). Diese Temperatur wird noch für 5 bis 6 Stunden beibehalten. Anschließend gießt man die erhaltene Reaktionslösung in 100 ccm einer 1 n Sodalösung und entfernt das Nitrobenzol durch Wasserdampfdestillation. Hierbei fällt die Benzpyren-5-carbonsäure, verunreinigt durch etwas Säurechlorid und die entsprechenden Benzpyren-10-derivate, als gelber Niederschlag aus. Aus dem Rohgemisch trennt man durch Chromatographie an Kieselgel in Chloroform zunächst die Säurechloride ab. Die isomeren Säuren werden durch präparative Dünnschichtchromatographie getrennt (Kieselgel G; System: C vergl. s. 8). Dabei erhält man die Benzpyren-5-carbonsäure als amorphen gelben Niederschlag. Aus sorgfältig gereinigtem Tetrahydrofuran gewinnt man die Verbindung in groben gelben Blättchen.

Schmelzpunkt: 283° zers.

Ausbeute: 375 mg = 64 % der Theorie

Analyse: $C_{21} H_{12} O_2$ Ber. C 84,8 H 4,96
Gef. C 84,76 H 4,98

UV-Spektrum: vergl. Abbild. 6 Seite 59

Den Methylester der Benzpyren-5-carbonsäure erhält man analog der Vorschrift für die 10-Säure von A.Windaus [24], indem man die in Dioxan suspendierte Säure mit ätherischer Diazomethanlösung 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen läßt. Aus einem Äthanol-Petroläther (etwa 3:1 Vol) erhält man den Ester in groben gelben Kristallen.

KMR-Spektrum: vergl. Abbild. 3 Seite 18

3,4-Benzpyren-5-carbonsäurechlorid

100 mg Benzpyren-5-carbonsäure werden in 40 ccm Phosphoroxychlorid suspendiert und unter starker Kühlung (-15° C) trägt man in möglichst kleinen Portionen 2,5 g PCl_5 ein. Diese Suspension wird anschließend zwei Stunden lang bei 20° C im Dunkeln geschüttelt, wobei sowohl die Säure als auch das PCl_5 in Lösung gehen. Hierauf gießt man die gelbbraune Reaktionslösung auf 500 g gestoßenes Eis, wobei darauf zu achten ist, daß das gesamte Phosphoroxychlorid hydrolysiert sein muß, bevor alles Eis geschmolzen ist (gegebenenfalls neues Eis hinzufügen). Die wässrige Suspension wird mit Chloroform extrahiert, wobei alles Säurechlorid in die organische Phase übergeht. Das Chloroform wird am Rotationsverdampfer abgezogen und der gelbe Rückstand aus Äthanol umkristallisiert.

Schmelzpunkt: 264°

Ausbeute: 64 mg = 68 % der Theorie

UV-Spektrum: vergl. Abbild. 7 Seite 59

Die Acylierung von 2,4,5-Triamino-6-hydroxypyrimidin mit 3,4-Benzpyren-5-carbonsäurechlorid

100 mg des Säurechlorids werden mit 120 mg des Pyrimidinderivats in 100 ccm trockenem Pyridin suspendiert. Außerdem fügt man dieser Mischung noch 20 bis 30 mg Natriumdithionit zu. Diese Suspension wird 70 bis 80 Stunden lang im Dunkeln unter Stickstoff am Rückfluß erhitzt. In Abständen von 8 bis 10 Stunden gibt man jeweils etwa 10 mg Natriumdithionit zu der Reaktionslösung.

Nach der angegebenen Reaktionsdauer ist im Dünnschichtchromatogramm einer entnommenen Probe nur noch wenig Benzpyrensäurechlorid nachweisbar. Man dampft die Reaktionslösung am Reaktionsverdampfer (Ölpumpe) zur Trockne ein und behandelt den Rückstand zweimal mit je 25 ccm Äthanol, wobei unumgesetztes Triaminohydroxypyrimidin ungelöst zurückbleibt. Durch präparative Dünnschichtchromatographie (Kieselgel G; System: C vergl.S. 8) isoliert man aus dem in der alkoholischen Lösung enthaltenen Produktgemisch das Acylprodukt als hellgelbes amorphes Pulver.

Ausbeute: 5 bis 6 mg
UV-Spektrum: vergl. Abbild. 8 Seite 60

Cyclisierung des Acylprodukts

10 mg Acylprodukt werden in 3 ccm 84 proz. Phosphorsäure gelöst, und unter starker Kühlung gibt man hierzu 4,5 g Phosphorpentoxyd. Nachdem man dieses Reaktionsgemisch auf Zimmertemperatur erwärmt hat, taucht man das Reaktionsgefäß in ein vorgeheiztes Ölbad (110° C) und rührt die Mischung bei 120° C unter einem kräftigen Stickstoffstrom für 15 bis 20 Minuten. Die noch heiße Lösung gießt man auf 250 g gestoßenes Eis, woraus man bald eine gelbgefärbte trübe Lösung erhält. Diese wird am pH-Meter mit 2 n Natronlauge neutralisiert, mit Äthanol auf das doppelte Volumen verdünnt und anschließend mit einer möglichst konzentrierten Bariumhydroxydlösung versetzt. Dabei muß soviel Bariumhydroxydlösung zugegeben werden, bis kein weißes amorphes

Bariumphosphat mehr ausfällt. Der Bariumphosphatbrei wird abgesaugt, in Äthanol suspendiert, für 5 Minuten mit einem Ultraschallgerät (Sonifier Fa. Branson) behandelt und schließlich vom Alkohol abzentrifugiert. Dieser Waschprozess wird zweimal wiederholt. Die Überstände der Zentrifugation werden mit den Filtraten der Fällung vereinigt, und anschließend fällt man am pH-Meter das überschüssige Barium als Bariumsulfat mit 1 n H_2SO_4 aus, wobei gleichzeitig die alkalische Lösung neutralisiert wird. Das Bariumsulfat wird abzentrifugiert und der Überstand im Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird zweimal mit je 25 ccm Äthanol ausgezogen, wobei Reste der anorganischen Salze ungelöst zurückbleiben. Die stark blau fluoreszierende alkoholische Lösung wird auf präp. Dünnschichtplatten aufgetragen, diese werden dreimal in reinem Benzol und anschließend im System B (vergl. S. 8) entwickelt. Dabei erscheint die blau fluoreszierende Zone des 3,4-Benzpyrenyl-5-guanin-8 mit dem R_f-Wert 0,7. Aus dieser Zone wird nach dem auf Seite 45 angegebenen Verfahren das Benzpyrenylguanin als hellgelber amorpher Niederschlag isoliert.

Der Vergleich mit dem Photolyseprodukt I (vergl. S. 12) wird mit dieser Substanz vorgenommen, während für das UV-Spektrum die dünnschichtchromatographische Reinigung wiederholt wird.

Röntgenbestrahlung einer mit Benzpyren gesättigten DNS-Lösung

Zu 25 ccm einer Lösung von 6 mg/ccm Heringssperma-DNS (Fa.Sigma) gibt man 70 mg fein zerriebenes 3,4-Benzpyren und schüttelt diese Suspension 14 Tage lang im Dunkeln bei -3 bis -5° C. Zur Abtrennung von ungelöstem Benzpyren wird durch eine Glasfritte filtriert. Im Anschluß daran läßt man für 2 bis 3 Stunden einen schwachen Stickstoffstrom durch die Lösung perlen, um hierauf - ebenfalls unter Stickstoff - die Lösung in eine kleine Petrischale umzufüllen. Diese wird mit einem Deckel verschlossen, der innen mit einer 2 mm starken Paraffinschicht (noch sehr weich) ausgegossen ist.

Die Röntgenbestrahlung wird unter einem Siemens-Bestrahlungsgerät vorgenommen, nachdem unter gleichen geometrischen Verhältnissen eine Dosisbestimmung ausgeführt wurde.(Dosis 20 Kr)

Nach der Bestrahlung wird die DNS mehrmals mit Äthanol gefällt und in frischen Tris-Puffer überführt, bis der alkoholische Überstand nicht mehr blau fluoresziert. Unter den in einem Vorversuch mit einer DNS-Lösung (ohne Benzpyren) ermittelten Bedingungen wird die bestrahlte DNS mit DN-ase I und anschließend mit Schlangengiftphosphodiesterase (beides Fa. Boehringer) zu den 5'-Nucleotiden abgebaut (Kontrolle am Spektralphotometer). Die aus diesem Abbau erhaltene Lösung wird bei 15 bis 20° C im Vakuum zur Trockne eingedampft,und den Rückstand nimmt man in 3 ccm Elektrophorese-Puffer (Natriumcarbonat-Puffer pH 10,5) auf. Bei der nachfolgenden papierelektrophoretischen Trennung wandern die 5'-Nucleotide (UV-absorbierende Zonen) vom Start weg, während die blau fluoreszierenden Benzpyrenprodukte dort verbleiben. Diese Auftrennung ist nach 10 bis 12 Stunden beendet. Für die Hydrolyse der Benzpyrenprodukte schneidet man die Startzone aus, eluiert den Streifen mit Äthanol (4 ccm), gibt zu dieser Lösung 0,5 ccm konz. HCl und erhitzt dieses Gemisch 15 Minuten am Rückfluß. Im Vakuum wird dann mehrmals mit Wasser bis zur Trockne eingedampft, um so die Salzsäure zu entfernen. Den Rückstand nimmt man schließlich im Elektrophorese-Puffer (DMSO-Natriumcarbonat-Puffer pH 11,5) auf und vergleicht diese Probe mit einer Lösung des 3,4-Benzpyrenyl-5-guanin-8 in der auf Seite 45 beschriebenen Weise. Dabei wandert die blau fluoreszierende Zone des Benzpyrenylguanins in 18 Stunden etwa 3,5 cm vom Start weg.

Umsetzung von 1-Phenyl-3,3-dimethyltriazen mit Guanosin-2'-(3')-monophosphat

0,5 ccm des nach Fr.Heusler [42] synthetisierten 1-Phenyl-3,3-dimethyltriazens werden zu einer Lösung von 50 mg Guanosin-2'-(3')-monophosphat in 25 ccm 0,1 m Tris-HCl-Puffer (pH 7,4) hinzugegeben. Zu dieser zunächst zweiphasigen Mischung fügt man

1 bis 2 ccm Dimethylformamid zu, so daß ein Teil des Phenyldimethyltriazens nun in Wasser gelöst ist, was an der Gelbfärbung der wässrigen Phase zu erkennen ist. Die Reaktionslösung beläßt man 48 Stunden bei 37° C im Thermostaten. Im Anschluß daran wird unverbrauchtes Triazen mit Äther extrahiert, während man zu der wässrigen Phase 1 ccm konz. HCl zugibt und dies 1 Stunde lang am Rückfluß erhitzt. Zur Entfernung der Salzsäure aus dem Hydrolysegemisch wird dieses mehrmals mit Wasser bis zur Trockne eingedampft. Den Rückstand nimmt man in 2 ccm Elektrophorese-Puffer (Natriumcarbonat-Puffer pH 11,5) auf und vergleicht die Probe mit einer Lösung von synthetischem 8-Phenylguanin. Sowohl in der Probe als auch im Vergleich wandern die blau fluoreszierenden Zonen des 8-Phenylguanins in 12 Stunden etwa 4 cm vom Start weg.

Weitere Vergleiche wurden im Papierchromatogramm (System: 2 n HCl) (R_f des 8-Phenylguanins 0,3) und im Dünnschichtchromatogramm (Zellulose System: Isopropanol:konz.HCl:Wasser / 170:41:39) (R_f des 8-Phenylguanins 0,2) vorgenommen.

Umsetzung von Diazomethan mit Guanosin-2'-(3')-monophosphat

Zu einer Lösung von 50 mg Guanosin-2'-(3')-monophosphat in 20 ccm 0,01 m Tris-HCl-Puffer (pH 7,0) und 10 ccm Methanol gibt man unter Kühlung (0 bis 5° C) in Abständen von 8 bis 10 Stunden jeweils 1 ccm einer ätherischen Diazomethanlösung. Nach 72 Stunden wird diese gesamte Reaktionslösung am Ratationsverdampfer zur Trockne eingedampft, in 5 ccm 1 n HCl aufgenommen und für 30 Minuten am Rückfluß erhitzt. Zur Entfernung der Salzsäure wird die Hydrolyse-Mischung mehrmals mit Wasser bis zur Trockne eingedampft. Den Rückstand nimmt man in 3 ccm konz. Ammoniak auf und trägt die Lösung auf drei oder vier Streifen (10 cm breit) Chromatographie-Papier (Whatman Nr. 1) auf. Daneben wird eine kleine Menge 8-Methylguanin als Marker aufgetragen. Die Trennung erfolgt absteigend im System Isobuttersäure:Ammoniak:Wasser; (40:0,04:20,8) 0,001 m EDTA.

Den Bereich von R_f = 0,55 bis R_f = 0,65 schneidet man aus dem Chromatogramm heraus, eluiert die Streifen mit konz. Ammoniak und wiederholt mit dem Eluat die papierchromatographische Trennung (System: Isobuttersäure:Ammoniak:Wasser; 40:0,04:20,8; 0,001 m EDTA). Neben verschiedenen blau fluoreszierenden Zonen erkennt man eine UV-absorbierende Zone, die den gleichen R_f-Wert (0,63) aufweist wie synthetisches 8-Methylguanin. Ein dünnschichtchromatographischer Vergleich (Zellulose System: Isopropanol:konz.HCl:Wasser / 170:41:39) zeigt ebenfalls das 8-Methylguanin in der Reaktionslösung (R_f 0,5).

In der Papierelektrophorese (Natriumcarbonatpuffer pH 10,5) wandert das 8-Methylguanin in 8 Stunden etwa 12 cm vom Start weg, während Guanin unter gleichen Bedingungen etwa 10,5 bis 11 cm wandert.

Umsetzung von N-nitroso-N-methyl-N-nitroguanidin mit Hefe-RNS

Zu einer Lösung von 30 mg Hefe-RNS (Fa. Bayer) in einer Mischung aus Dimethylformamid und 0,01 m Tris-HCl-Puffer (1:4 Vol.) gibt man 20 mg NMNG und läßt diese Lösung 4 Tage bei 37° C im Thermostaten stehen. Im Anschluß daran gibt man zu der Lösung 1 ccm konz. HCl und erhitzt für 1 Stunde am Rückfluß. Zur Entfernung der Salzsäure wird mehrmals mit Wasser im Vakuum zur Trockne eingedampft. Den Rückstand nimmt man hierauf in konz. Ammoniak auf, um damit nach einer chromatographischen Vortrennung (vergl. oben, Reaktion mit Diazomethan) die Vergleiche mit 8-Methylguanin, analog den Verfahren beim Diazomethan, durchzuführen. Sowohl in der Papierelektrophorese (Natriumcarbonat-Puffer pH 11,5) als auch im Papierchromatogramm (System: Isobuttersäure:Ammoniak:Wasser; 40:0,04:20,8; 0,001 m EDTA) ist eine schwache UV-absorbierende Zone zu erkennen, die den gleichen R_f- bzw. R_c-Wert hat wie synthetisches 8-Methylguanin.

Umsetzung von Diazoessigester mit Guanosin-2'-(3')-monophosphat

Läßt man analog der Reaktion des Diazomethans (vergl. S. 54) den Diazoessigester mit Guanosin-2'-(3')-monophosphat in Tris-HCl-Puffer (pH 7,4) mit Dimethylformamid für mehrere Tage bei 37° stehen, so erhält man einen sehr geringen Umsatz an Guanosinmonophosphat. Neben der Base findet man nach der Hydrolyse bei der chromatographischen Auftrennung geringe Mengen blau fluoreszierender Produkte.

Umsetzung von Diazoessigester mit Guanosin-2'-(3')-monophosphat unter UV-Bestrahlung

Hierfür werden 120 mg Guanosin-2'-(3')-monophosphat in 100 ccm Tris-HCl-Puffer (pH 7,4) gelöst, mit 15 ccm Dimethylformamid und 10 ccm Diazoessigester vermischt und hierauf 25 Stunden lang mit einer Quecksilbertauchlampe (QS 81 Fa. Quarzlampengesellschaft Hanau) bestrahlt. Die Reaktionslösung wird im Vakuum zur Trockne eingeengt und der Rückstand in 25 ccm 1 n HCl am Rückfluß erhitzt. Nach anschließender Entfernung der Salzsäure durch mehrmaliges Eindampfen mit Wasser wird der Rückstand in konz. Ammoniak für chromatographische Vergleiche und in Elektrophorese-Puffer (Natriumcarbonat-Puffer pH 11,5) für elektrophoretische Vergleiche aufgenommen. Auch nach einer chromatographischen Vortrennung - analog dem auf S. 55 beschriebenen Verfahren beim Diazomethan - ist im Pherogramm durch Vergleich mit synthetischem Material keine der zahlreichen blau fluoreszierenden Zonen als Guanin-8-essigsäureäthylester (vergl. W.Traube [41]) sicher zu identifizieren.

Reaktion von 4-Hydroxylaminochinolin-N-oxyd (HANO) mit Guanosin-2'-(3')-monophosphat

25 mg des nach E.Ochiai [36] synthetisierten HANO-Hydrochlorids werden mit 50 mg Guanosin-2'-(3')-monophosphat in Tris-HCl-Puffer (pH 7,8) gelöst, mit 4 bis 5 mg Natriumdithionit versetzt und für 48 Stunden bei 37° C im Thermostaten belassen. Während

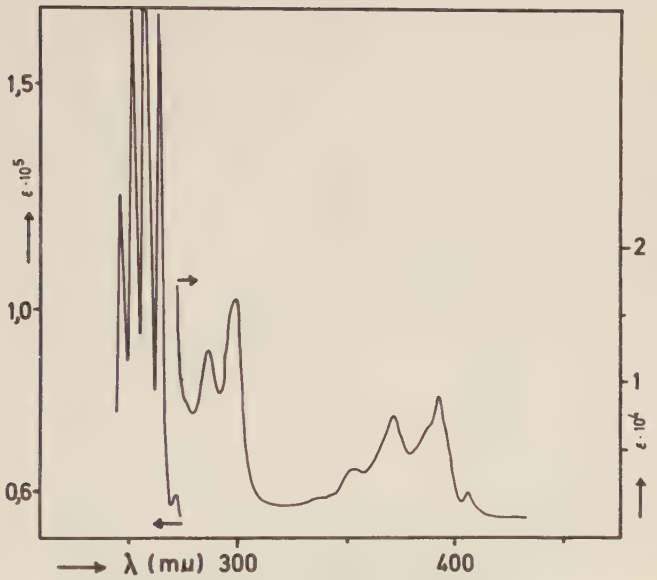
der gesamten Reaktionszeit läßt man einen mäßigen Stickstoffstrom durch die Lösung perlen. Im Anschluß daran wird die Reaktionslösung im Vakuum zur Trockne eingedampft, den Rückstand nimmt man in 10 ccm 1 n HCl auf und erhitzt die Lösung für 1 Stunde am Rückfluß. Zur Entfernung der Salzsäure wird das Hydrolysat mehrmals mit Wasser zur Trockne eingeengt. Den Rückstand nimmt man in Elektrophorese-Puffer (DMSO-Natriumcarbonatpuffer pH 11,5) auf und vergleicht diese Lösung nach dem auf S. 45 beschriebenen Verfahren mit einem Kontrollansatz (ohne GMP) in der Papierelektrophorese. Dabei ist im Reaktionsansatz (mit Nucleotid) nach 16 Stunden Laufzeit neben der gelbgrün fluoreszierenden Zone des Ausgangsprodukts (~ 12 cm vom Start) und einer orange fluoreszierenden Zone (~ 6 cm vom Start) eine weitere gelbgrün fluoreszierende Zone (~ 4 cm vom Start) zu erkennen.

Umsetzung von 4-Hydroxylaminochinolin-N-oxyd (HANO) mit DNS

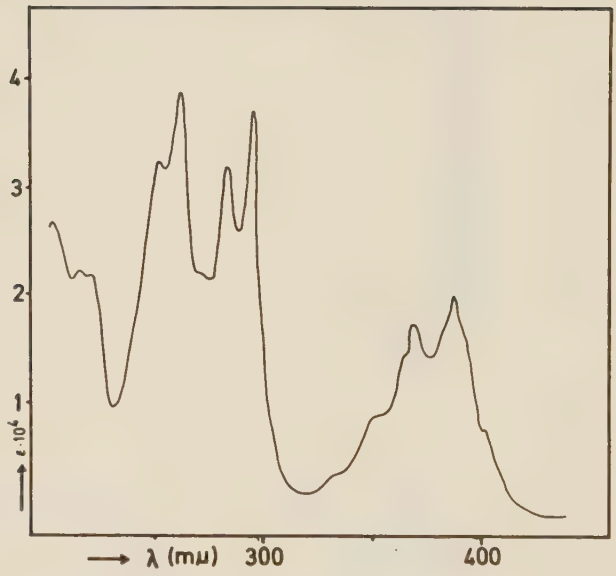
Zu 20 ccm einer Lösung (5 mg/ccm) von Heringssperma-DNS (Fa. Sigma) in Tris-HCl-Puffer (pH 7,8) gibt man 5 mg Natriumdithionit und 10 mg HANO-Hydrochlorid. Unter Stickstoff beläßt man diese Lösung für 48 Stunden im Thermostaten bei 37° C. Im Anschluß daran wird die DNS zur Abtrennung von unverbrauchtem HANO viermal mit Äthanol gefällt und jeweils in frischen Tris-HCl-Puffer (pH 7,4) überführt. Analog dem auf S. 53 beschriebenen Verfahren wird die DNS enzymatisch (DN-ase I; Schlangengiftphosphodiesterase) zu den 5'-Nucleotiden abgebaut und auf der Papierelektrophorese (Natriumcarbonat-Puffer pH 1o,5) aufgetrennt. Dabei wandern die UV-absorbierenden Zonen der Nucleotide in 2 bis 3 Stunden vom Start weg, während gelbgrün fluoreszierende Zonen dort zurückbleiben. Diese Startzone wird ausgeschnitten und mit konz. Ammoniak eluiert (4 ccm). Nach Entfernung des Ammoniaks im Vakuum wird der Rückstand in 10 ccm 1 n HCl aufgenommen und 1 Stunde am Rückfluß erhitzt. Die Salzsäure wird anschließend durch mehrmaliges Einengen der Lösung mit Wasser im Vakuum entfernt. Den Rückstand nimmt man in Elektro-

phorese-Puffer (DMSO-Natriumcarbonat pH 11,5) auf und vergleicht diese Probe mit der Reaktionslösung des vorher beschriebenen Versuchs (mit 2'-(3')-GMP). Nach 15 bis 16 Stunden Laufzeit ist in beiden Lösungen eine gelbgrün fluoreszierende Zone in 4 cm Abstand vom Start zu erkennen.

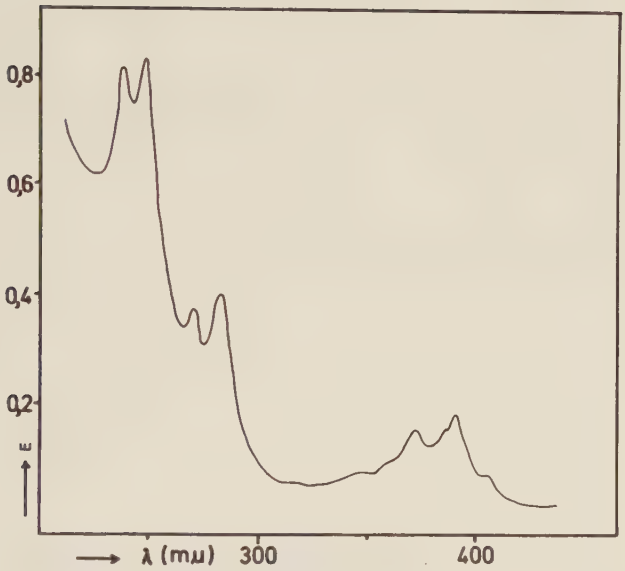
Die Mikroanalysen führten die Herren Dr.O.Pfundt und M.Beller durch. Die NMR-Spektren wurden von Frau I.Beller und Herrn H.Leonhard aufgenommen.
Ihnen allen möchte ich an dieser Stelle herzlich danken.
Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für eine finanzielle Unterstützung.



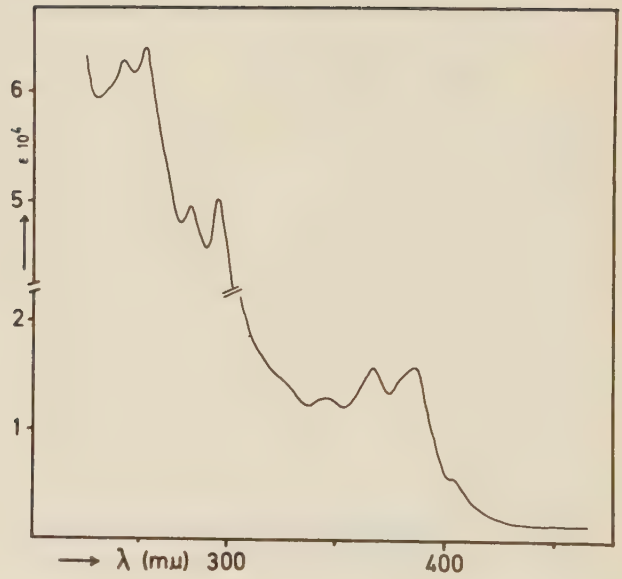
Abbild. 6 Absorptionskurve von 3,4-Benzpyren-5-carbonsäure in Äthanol
(λ_{max} 407, 393, 372, 354, 300, 287, 373, 264, 258, 251, 246 mμ)



Abbild. 7 Absorptionskurve von 3,4-Benzpyren-5-carbonsäure-chlorid in Äthanol
(λ_{max} 402, 388, 369, 353, 295, 288, 262, 252 mμ)



Abbild. 8 Absorptionskurve des Acylprodukts (2) vergl. S. 14
(λ_{max} 406, 392, 373, 349, 285, 270, 248, 238 mμ)



Abbild. 9 Absorptionskurve von 3,4-Benzpyrenyl-5-guanosin-8 in Äthanol
(λ_{max} 403, 385, 367, 345, 299, 282, 252, 242 mμ)

Literaturverzeichnis

1. E.Clar
"Polycyclic Hydrocarbons" Vol. 1 S. 133 (Acad.Press. New York 1964)

2. J.H.Weisburger; E.K.Weisburger
Chemical and Engineering News 43, 124 (1966)

3a. C.Heidelberger
in Ciba Foundation Symposium on "Carcinogenesis; Mechanism of Action" S. 179 (Churchill London 1959)

3b. J.A.Miller; E.C.Miller
Cancer Res. 7, 468 (1947)

4. E.Kriek; J.A.Miller
Biochemistry 6, 177 (1967)

5. M.Tada; T.Takahashi
Biochem.Biophys.Res. Commun. 29, 469 (1967)

6. S.A.Rapaport; P.O.P.Ts'o
Proc.nat.Acad.Sc. USA 55, 381 (1966)

7. H.D.Hoffmann; W.Müller
Biochem.Biophys.Acta 123, 421 (1966)

8. P.N.Magee; E.Farber
Biochem. J. 83, 114 (1962)

9. H.F.Park
J.Phys.u.Colloid.Chem. (Baltimore) 54, 1383 (1950)

10. L.F.Fieser; M.Fieser
Lehrbuch d.org.Chemie (Verl.Chemie Weinheim) 1960 S. 920

11. L.F.Fieser; S.T.Putnam
J.amer.chem.Soc. 69, 1041 (1947)

12. H.F.Park
J. amer.chem.Soc. 69, 2248 (1947)

13. V.Ullrich; H.Staudinger
in "Biological and Chemical Aspects of Oxygenases"
(K.Bloch; O.Hayaishi, Maruza Comp.Tokyo 1966)

14. C.Ponamperuma; M Calvin
Rad.Res. 18, 540 (1963)

15. G.Hems
Nature 181, 525 (1960)

16. A.Weisberger
"Heterocyclic Compounds; Pyridine" Vol. 1 S. 25
(Intsc.Publ.New York 1960)

17. H.Terzian; J.F.E.Chinoperos
J.org.Chem. 30, 1916 (1965)

18. E.Wilk
Z.f.Naturforschung 23 b, 431 (1968)

19. P.O.P.Ts'o; R.S.Umans
Biophys. J. 8, A 75 (1968) 12.Ann.Meeting

20. J.M.Rice
J.amer.chem.Soc. 86, 1444 (1964)

21. L.F.Fieser; E.B.Hershberg
J.amer.chem.Soc. 61, 1565 (1939)

22. L.F.Fieser; W.P.Campbell
J.amer.chem.Soc. 60, 1142 (1938)

23. L.F.Fieser; E.B.Hershberg
J.amer.chem.Soc. 60, 2542 (1938)

24. A.Windaus; K.Raichle
Annalen 537, 157 (1939)

25. W.Mejbaum
Z.physiol.Chem. 258, 117 (1939)

26. H.G.Latham jr; E.Mosettig
J.amer.chem.Soc. 70, 1079 (1948)

27. H.Moureu; P.Chovin; G.Rivoal
Comptes rend.hebd. 223, 951 (1946)

28. H.Druckrey
Nachrichten aus Chemie und Technik 67, 128 (1967)

29. P.N.Magee; J.M.Barnes
Adv. of Cancer Res. Vol. 10 S. 164 (1967)

30. R.Schoenthal
Nature London 192, 670 (1961)

31. R.Schoenthal
Biochem. J. 102, 5 c (1967)

32. B.Singer; H.Fraenkel-Conrat
Proc.natl.Acad.Sc. USA 58, 234 (1967)

33. M.Freedman
Boichem.Biophys.acta 23, 215 (1957)

34. T.Sugimura; K.Okabe
Cancer Res. 26, 1717 (1966)

35. N.Kataoka et. al.
Bull.chem.Soc.Jap. 40, 62 (1967)

36. E.Ochiai
Chem.pharm.Bull.Japan 11, 1084 (1963)

37. P.O.P.Ts'o
priv. Mitteilung

38. J.A.V.Butler
Nature 166, 18 (1950)

39. A.C.Allison
Nature 197, 758 (1963)

40. R.O.C.Norman; G.K.Radda
in H.Katritzky Adv.Heterocyclic Chem.Vol.2 S. 154
(Acad.Press New York 1963)

41. W.Traube
Annalen 432, 283 (1923)

42. Fr.Heusler
Annalen 260, 249 (1890)

Lebenslauf

Am 12. März 1940 wurde ich, Hans-Dieter Hoffmann, als Sohn des Universitätsprofessors Dr. Hans Hoffmann und seiner Ehefrau Dr. Hilde, geb. Leuschel, in Jena geboren. Vom 1.9.1946 bis 3.7.1954 besuchte ich die Grundschule in Jena. Aus politischen Gründen verließ ich mit meiner Mutter am 8.7.1954 die Sowjetzone. Für ein Jahr besuchte ich das Städtische Realgymnasium in Bietigheim bei Stuttgart. Im August 1955 siedelte ich nach Kassel über, wo ich vom 17.8.1955 bis 4.3.1960 die Albert-Schweitzer-Schule besuchte. Nach Abschluß der Schulzeit mit der Reifeprüfung begann ich im Sommersemester 1960 mit dem Studium der Chemie an der Georg-August-Universität in Göttingen. Am 4.11.1963 bestand ich nach Abschluß der Grundpraktika das Diplomvorexamen und fertigte darauf von April 1964 bis Dezember 1965 am Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen unter der Leitung von Herrn Privatdozent Dr. W. Müller meine Diplomarbeit "Zur Reaktion des Guanosins mit Diazoniumsalzen; ein Weg zur Fluoreszenzmarkierung von Nucleinsäuren" an. Am 23.2.1966 legte ich das Diplomhauptexamen ab. Seit Februar 1966 arbeitete ich ebenfalls unter der Leitung von Herrn Privatdozent Dr. W. Müller an der vorliegenden Dissertation.

Meine Lehrer waren die Herren Professoren Dr.H.Brockmann, Dr.A.Flammersfeld, Dr.B.Franck, Dr.O.Glemser, Dr.W.Jost, Dr.W.Lüttke, Dr.H.-G.Schlegel, Dr.A.Schneider, Dr.U.Schöllkopf, Dr.G.Spiteller, Dr.H.Strehlow, Dr.H.G.Wagner, Dr.J.Zemann und Herr Privatdozent Dr.W.Müller.